

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil.  
Katrin Hartmann

**Viren und das Bakterium *Bordetella bronchiseptica* bei  
akuten respiratorischen Infektionen des Hundes**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der  
Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Susanne Martina Kurz  
aus Schorndorf

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Gerd Sutter

Univ.-Prof. Dr. Kaspar Matiasek

Tag der Promotion: 20. Juli 2013

*In Liebe und Dankbarkeit*

*Meinen Eltern und Geschwistern*

*Meinem Opa*

---

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>2</b>
<b>1.</b>	<b>Virale Erreger.....</b>	<b>2</b>
1.1.	Canines Parainfluenzavirus.....	2
1.1.1.	Ätiologie.....	2
1.1.2.	Epidemiologie .....	4
1.1.3.	Pathogenese.....	6
1.1.4.	Klinische Symptome.....	6
1.1.5.	Diagnostik .....	7
1.2.	Canines Adenovirus Typ 2.....	8
1.2.1.	Ätiologie.....	8
1.2.2.	Epidemiologie .....	9
1.2.3.	Pathogenese.....	10
1.2.4.	Klinische Symptome.....	11
1.2.5.	Diagnostik .....	11
1.3.	Canines Influenzavirus.....	12
1.3.1.	Ätiologie.....	12
1.3.2.	Epidemiologie .....	13
1.3.3.	Pathogenese.....	15
1.3.4.	Klinische Symptome.....	16
1.3.5.	Diagnostik .....	17
1.4.	Canines respiratorisches Coronavirus.....	18
1.4.1.	Ätiologie.....	18
1.4.2.	Epidemiologie .....	19
1.4.3.	Pathogenese.....	22
1.4.4.	Klinische Symptome.....	22

1.4.5.	Diagnostik .....	23
1.5.	Canines Herpesvirus .....	24
1.5.1.	Ätiologie.....	24
1.5.2.	Epidemiologie .....	24
1.5.3.	Pathogenese.....	26
1.5.4.	Klinische Symptome.....	28
1.5.5.	Diagnostik .....	29
1.6.	Canines Staupevirus.....	29
1.6.1.	Ätiologie.....	30
1.6.2.	Epidemiologie .....	30
1.6.3.	Pathogenese.....	32
1.6.4.	Klinische Symptome.....	33
1.6.5.	Diagnostik .....	35
1.7.	Weitere virale Erreger.....	37
<b>2.</b>	<b>Bakterielle Erreger .....</b>	<b>37</b>
2.1.	<i>Bordetella bronchiseptica</i> .....	38
2.1.1.	Ätiologie.....	38
2.1.2.	Epidemiologie .....	38
2.1.3.	Pathogenese.....	40
2.1.4.	Klinische Symptome.....	41
2.1.5.	Diagnostik .....	42
2.2.	Weitere bakterielle Erreger .....	43
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>44</b>
<b>1.</b>	<b>Material.....</b>	<b>44</b>
1.1.	Patientengut .....	44
1.2.	Ein- und Ausschlusskriterien .....	44
1.3.	Signalement .....	45

1.3.1.	Alter .....	45
1.3.2.	Geschlecht .....	45
1.3.3.	Rasse .....	46
1.4.	Anamnese .....	48
1.4.1.	Herkunft des Tieres und Lebensraum .....	48
1.4.2.	Auslandsaufenthalt .....	49
1.4.3.	Kontakttiere .....	49
1.4.4.	Kontakt zu Hundepopulationen .....	50
1.4.5.	Impfung .....	51
1.4.6.	Jahreszeitliches Auftreten von respiratorischen Symptomen .....	51
1.4.7.	Krankheitsverlauf .....	52
1.4.8.	Akute Atemwegssymptome bei Hunden aus der Umgebung .....	52
<b>2.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>54</b>
2.1.	Studienaufbau .....	54
2.2.	Durchgeführte Untersuchungen .....	54
2.2.1.	Klinische Untersuchung .....	54
2.2.2.	Blutprobenentnahme .....	55
2.2.3.	Tupferprobenentnahme .....	55
2.3.	Erregernachweis .....	56
2.3.1.	Viren .....	56
2.3.2.	<i>Bordetella bronchiseptica</i> .....	57
2.3.2.1.	Aufarbeitung und Isolierung der Desoxyribonukleinsäure .....	57
2.3.2.2.	Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion .....	59
2.3.2.3.	Gelelektrophoretischer Nachweis .....	61
2.4.	Statistische Auswertung .....	63
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>65</b>
<b>1.</b>	<b>Auswertung der Tupferproben .....</b>	<b>65</b>

---

1.1.	Prävalenz der Erreger.....	65
1.1.1.	Viren .....	65
1.1.2.	<i>Bordetella bronchiseptica</i> .....	66
1.1.3.	Mischinfektionen .....	66
1.2.	Vergleich der Erregergruppen.....	67
1.2.1.	Signalement .....	67
1.2.2.	Anamnese .....	68
1.2.3.	Klinische Untersuchung .....	72
1.2.4.	Labordiagnostische Untersuchung .....	75
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>78</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>94</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>96</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>98</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>123</b>
1.	Anamnesebogen für Patientenbesitzer.....	123
2.	Untersuchungsbogen .....	125
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>126</b>

---

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
A	Adenin
<i>B. bronchiseptica</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
<i>B. parapertussis</i>	<i>Bordetella parapertussis</i>
<i>B. pertussis</i>	<i>Bordetella pertussis</i>
BALF	Bronchoalveolarlavage-Flüssigkeit
BCoV	bovines Coronavirus
bp	Basenpaare
bpt	Bundesverband praktizierender Tierärzte
C	Cytosin
CAV	canines Adenovirus
CAV-1	canines Adenovirus Typ 1
CAV-2	canines Adenovirus Typ 2
CDV	canines Staupevirus
CHV	canines Herpesvirus
CIRD	canine infectious respiratory disease (caniner infektiöser respiratorischer Krankheitskomplex)
CIV	canines Influenzavirus
CnPnV	canines Pneumonievirus
CPIV	canines Parainfluenzavirus
CRCoV	canines respiratorisches Coronavirus
dl	Deziliter
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)



---

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIV	equines Influenzavirus
ELISA	enzyme-linked immunsorbent assay (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
F. C. I.	Fédération Cynologique Internationale (Weltorganisation der Kynologie)
<i>fla</i> -Gen	Flagellin-Gen
G	Guanin
ggr.	geringgradig
H	Hämagglutinin
HCoV	humanes Coronavirus
hgr.	hochgradig
HHT	Hämagglutinationshemmtest
IFT	Immunfluoreszenztest
ITB	infektiöse Tracheobronchitis
kb	Kilobase
KI	Konfidenzintervall
l	Liter
l/l	Liter pro Liter
LPS	Lipopolysaccharid
MAA	<i>Maackia-amurensis</i> -Lektin
Max.	Maximum
MDCK	Madin-Darby canine kidney cells (Madin-Darby- Hundenierenzellen)
mg	Milligramm

---

mgr.	mittelgradig
Min.	Minimum
ml	Milliliter
mmol/l	Millimol pro Liter
N	Neuraminidase
n	Anzahl
nm	Nanometer
NTC	negative template control (negative Kontrollprobe)
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pmol	Pikomol
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction (Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)
SA 2,3-Gal	Sialinsäure- -2,3-Galaktose
SARS	severe acute respiratory syndrome (schweres akutes Atemwegssyndrom)
SD	Standardabweichung
SNT	Serumneutralisationstest
spp.	Spezies
ssRNA	single-stranded ribonucleic acid (einzelsträngige Ribonukleinsäure)
StIKo Vet.	Ständige Impfkommision Veterinär
SV-5	simian Virus 5

---

T	Thymin
T <sub>M</sub>	Schmelztemperatur
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
VNT	Virusneutralisationstest
ZNS	zentrales Nervensystem

## I. EINLEITUNG

Unter dem Begriff caniner infektiöser respiratorischer Krankheitskomplex (canine infectious respiratory disease ó CIRD) oder canine infektiöse Tracheobronchitis (ITB), beides auch bekannt als šZwingerhustenš, werden akute, hochkontagiöse respiratorische Infektionen bei Hunden zusammengefasst, bei der vor allem Larynx, Trachea, Bronchien und gelegentlich auch die Nasenschleimhaut und die tieferen Atemwege erkrankt sind (APPEL & BINN, 1987a). Milde bis schwere Episoden von keuchendem oder würgendem Reizhusten und anderen respiratorischen Beschwerden, wie Nasenausfluss, Niesen und Dyspnoe, sind charakteristische klinische Anzeichen (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007). CIRD zeigt eine weltweite Verbreitung und wird als eine der häufigsten Infektionskrankheiten bei Hunden angesehen (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007). Am häufigsten wird der Krankheitskomplex bei Hunden beschrieben, die in einer dichten Hundepopulation gehalten werden, wie beispielsweise in Tierheimen und Tierpensionen (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007).

Verschiedene Viren und Bakterien können ätiologisch am CIRD-Komplex beteiligt sein. Als Hauptverursacher werden das canine Parainfluenzavirus (APPEL & PERCY, 1970), das canine Adenovirus Typ 2 (APPEL & BINN, 1987a; FORD, 2006) und *Bordetella bronchiseptica* (BEMIS et al., 1977c) angesehen; daneben werden andere virale Erreger, wie das canine Influenzavirus, das canine respiratorische Coronavirus, das canine Herpesvirus und das canine Staupevirus, als auslösende Pathogene diskutiert (DITCHFIELD et al., 1962; WRIGHT et al., 1974; ERLES et al., 2003; CRAWFORD et al., 2005).

Bislang wurden in Deutschland keine Untersuchungen zur Prävalenz der Erreger bei Hunden mit CIRD durchgeführt. Ziel der Studie war es deshalb, die Bedeutung dieser Viren sowie der von *Bordetella bronchiseptica* bei Hunden mit akuten respiratorischen Infektionen und bei klinisch gesunden Hunden zu untersuchen.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Virale Erreger

Bei akuten respiratorischen Infektionen des Hundes können verschiedene virale Erreger ätiologisch eine Rolle spielen. Zu den wichtigsten viralen Pathogenen gehören das canine Parainfluenzavirus (CPIV), das canine Adenovirus Typ 2 (CAV-2), das canine Influenzavirus (CIV), das canine respiratorische Coronavirus (CRCoV), das canine Herpesvirus (CHV) und das canine Staupevirus (CDV) (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007).

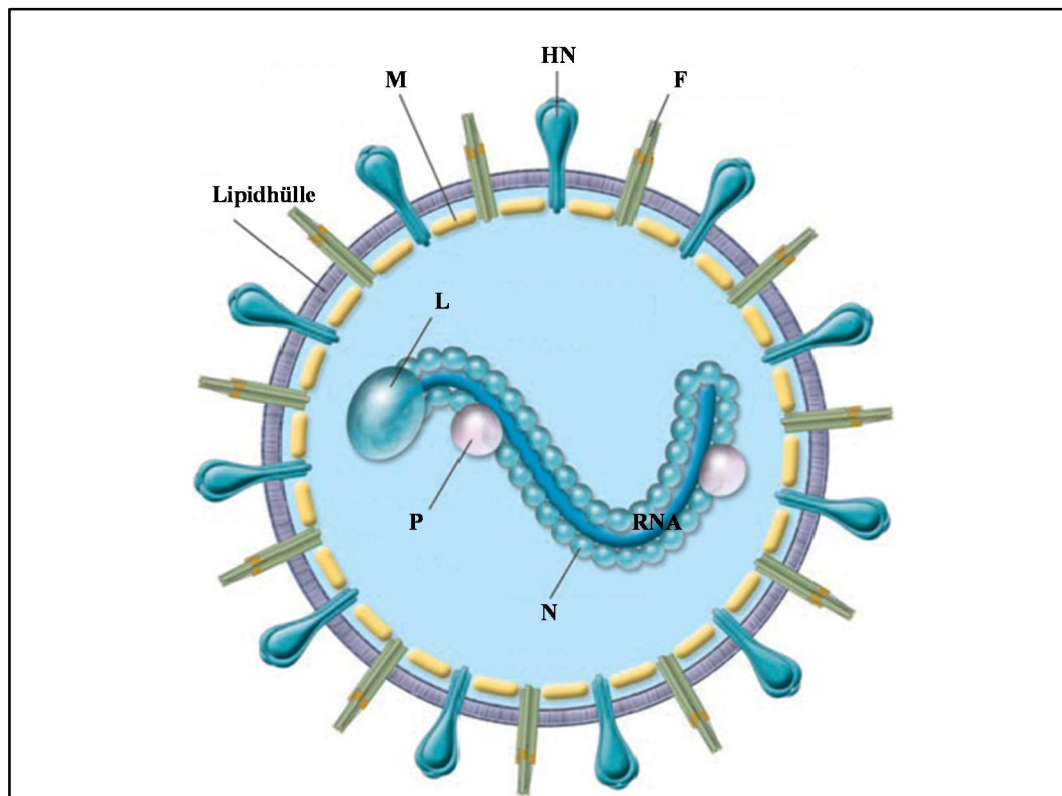
#### 1.1. Canines Parainfluenzavirus

Das CPIV wird als ein bedeutender ätiologischer Erreger für den Zwingerhusten angesehen (CRANDELL et al., 1968; MCCANDLISH et al., 1978; APPEL & BINN, 1987b). Abgesehen von wenigen epidemiologischen Studien wurde in den letzten 20 Jahren nur wenig Forschung zur Untersuchung des CPIV betrieben (ELLIS & KRAKOWKA, 2012).

##### 1.1.1. Ätiologie

Das CPIV gehört zur Ordnung *Mononegavirales* der Familie *Paramyxoviridae* und zum Genus *Rubulavirus* der Subfamilie *Paramyxovirinae* (KARRON & COLLINS, 2007). Es wurde 1967 zum ersten Mal zusammen mit weiteren Erregern, wie dem caninen Herpesvirus, dem Toronto-A-26/61-Virus und dem caninen Adenovirus Typ 1 (CAV-1), bei Laborhunden mit respiratorischen Infektionen nachgewiesen (BINN et al., 1967).

Das Virus hat einen Durchmesser von 150 ó 250 Nanometern (nm) und ist aus einer einsträngigen Ribonukleinsäure (ssRNA) mit negativer Polarität aufgebaut. Die Ribonukleinsäure (RNA) des CPIV besitzt sieben Gene, die für acht Proteine kodieren. Dazu gehören Strukturproteine, wie das Nukleokapsidprotein, das Phosphoprotein, das Matrixprotein, das Fusionsprotein, das Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein und das  $\sigma$ -Large- $\sigma$ -Protein sowie ein kleines hydrophobes Protein, das eine Besonderheit des CPIV darstellt (LAMB & KOLAKOSKY, 2001; KARRON & COLLINS, 2007). Der Aufbau eines CPIV ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung eines Parainfluenzavirus: Ribonukleinsäure (RNA), Matrixprotein (M), Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein (HN), Fusionsprotein (F), Phosphoprotein (P), "Large"-Protein (L), Nukleokapsidprotein (N) (modifiziert nach HALL, 2001).

Die Strukturproteine sind maßgeblich am Ablauf einer Infektion beteiligt. Die Hämagglutinin-Neuraminidase ist ein transmembranöses Zell-Adsorptionsprotein, das die Kontaktaufnahme zwischen Virus und Wirtszelle fördert (MARKWELL, 1991). Die Neuraminidase entfernt nach erfolgreicher Adsorption des Virus in die Zelle den Wirtszell-Rezeptor (N-Acetyl-Neuraminsäurerest), um eine Reinfektion der gleichen Zelle zu verhindern (LAMB & KOLAKOFSKY, 2001; MODROW et al., 2003; LAMB et al., 2006). Das Fusionsprotein ist, neben dem Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein, das zweite Transmembranprotein. Dieses Protein induziert die Verschmelzung der Virushülle mit der Wirtszellmembran (SANDERSON et al., 1993). Diese beiden Proteine sind für den Beginn einer Infektion essenziell und ragen bis zu 12 nm über die Virushülle hinaus, um so einen idealen Kontakt zur Zielzelle herstellen zu können (LAMB & KOLAKOFSKY, 2001). Das Matrixprotein ist an der Lumenseite der Virusmembran lokalisiert und interagiert mit dem Fusions- und Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein und dem Nukleokapsid. Es trägt zur Ausbildung neuer Viren bei und schnürt neue Viruspartikel von der Wirtszelle ab (MODROW et al.,

2003). Das kleine hydrophobe Protein, das eine Besonderheit des CPIV darstellt, moduliert die Apoptose der infizierten Zelle und ist mit der Hüllmembran des Virus verbunden (KARRON & COLLINS, 2007).

Die restlichen Strukturproteine bilden, zusammen mit der RNA, das Nukleokapsid. Das „Large“-Protein besitzt die enzymatische Aktivität einer RNA-abhängigen Polymerase (MODROW et al., 2003). Das Phosphoprotein ist für die Hemmung der Interferonsignale verantwortlich, die durch den Proteasomen-vermittelten Abbau des Signalgebers und Aktivators der Signaltransduktion herbeigeführt wird (DIDCOCK et al., 1999; YOUNG et al., 2000; ANDREJEVA et al., 2002; PARISIEN et al., 2002; ULANE & HORVATH, 2002) und inhibiert durch einen noch unbekannten Mechanismus die Interferonsynthese der Wirtszelle (HE et al., 2002; POOLE et al., 2002; WANSLEY & PARKS, 2002). Diese Hemmung des Interferonsystems durch das Virus stellt den entscheidenden Punkt beim Ausbruch der Infektion dar (STARK et al., 1998; GOODBOURN et al., 2000; BIRON & SEN, 2001; LEVY & GARCIA-SASTRE, 2001; SEN, 2001). Umgeben wird das Nukleokapsid von einer Lipidhülle, die aus Wirtszellmembran gebildet wird (MODROW et al., 2003).

### **1.1.2. Epidemiologie**

Das Auftreten einer Infektion mit dem CPIV korreliert mit der Dichte der Hundepopulation. Werden Hunde in engem Kontakt zueinander gehalten, kann sich das Virus sehr schnell weiterverbreiten, und ein großer Anteil der Hunde entwickelt in kurzer Zeit eine Infektion (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007). In einer Studie konnten Binn und Mitarbeiter (1970b) die hohe Kontagiosität des CPIV nachweisen. Sie fanden heraus, dass die Anzahl von Labor- und Militärhunden, die nach Ankunft in einem Zwinger Antikörper gegen das Virus aufwiesen, von ursprünglichen 3,0 % auf 72,0 % innerhalb von sechs Wochen angestiegen war (BINN et al., 1970b).

Das Virus wird acht bis zehn Tage nach Infektion über Sekrete des Respirationstrakts ausgeschieden. Freigesetzte Viren können in der Umwelt nur kurz überleben, so dass eine Infektion durch eine kontaminierte Umgebung selten stattfindet. Eine Infektion erfolgt somit meist durch den direkten Kontakt mit infizierten Hunden (APPEL & BINN, 1987b).

Innerhalb der letzten 20 Jahre wurden in England, Japan, Schweden und Norwegen epidemiologische Studien zum Nachweis des CPIV in Hundepopulationen durchgeführt. In nachstehender Tabelle 1 werden die Ergebnisse der einzelnen Studien aufgeführt.

**Tabelle 1: Ergebnisse der epidemiologischen Studien zum Nachweis des caninen Parainfluenzavirus in verschiedenen Hundepopulationen (RT-PCR = Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion).**

Land	Population	Anzahl/ Probenmaterial	RT-PCR	Antikörper- nachweis	Literatur- angabe
<b>England</b>	Hunde mit akuten Atemwegs- infektionen	170 Trachealspülproben 106 Lungenspülproben	20,0 % (33/170) 10,0 % (11/106)	-	Erles et al., 2004
<b>Japan</b>	Hunde mit akuten Atemwegs- infektionen	68 Nasentupferproben	7,4 % (5/68)	-	Mochizuki et al., 2008
<b>Schweden</b>	unselektierte Hundepopulation	279 Serumproben	-	28,0 % (79/279)	Englund et al., 2003
<b>Norwegen</b>	Hunde mit respiratorischen Symptomen	52 gepaarte Serumproben	-	79,0 % (41/52)	Ueland, 1990

Es besteht eine antigenetische Verwandtschaft des CPIV mit dem simian Virus 5 (SV-5) der Affen sowie mit dem porcinen, bovinen, ovinen und feline Parainfluenzavirus (BINN et al., 1967; CRANDELL et al., 1968; AJIKI et al., 1982). Sequenzanalysen des Fusionsprotein-codierenden Gens ergaben zwischen dem CPIV und dem porcinen Parainfluenzavirus eine 99,3%ige und zwischen dem CPIV und dem SV-5 eine 98,5%ige Übereinstimmung der Nukleotide (MENG et al., 2003). Das SV-5 besitzt die Möglichkeit, neben Hunden und Affen auch Schweine, Mäuse, Hamster und Katzen zu infizieren (CHANG & HSIUNG, 1965; SAONA-BLACK, 1969; HSIUNG, 1972). Außerdem wird vermutet, dass das SV-5 oder ein eng verwandtes Paramyxovirus in der Lage ist, Menschen zu infizieren. Derzeit ist jedoch noch wenig über eine mögliche virale Übertragung zwischen Hund und Mensch bekannt (HSIUNG, 1972).

Auch Katzen können mit dem CPIV infiziert werden ohne klinisch zu erkranken. Sie können das Virus jedoch ausscheiden und somit ein Reservoir für Hunde darstellen (BLACK & LEE, 1970).



### 1.1.3. Pathogenese

Eine Monoinfektion mit dem CPIV kann bei Hunden jeglichen Alters auftreten und beschränkt sich bei immunkompetenten Hunden meist auf den oberen Atmungstrakt (APPEL & BINN, 1987b). Nach Inhalation von Viruspartikeln kommt es zur Replikation des Virus in Epithelzellen der Nasenschleimhaut, des Pharynx, der Trachea und der Bronchien. Eine Replikation in Makrophagen findet nicht statt. Aus diesem Grund stellen diese Zellen eine Barriere für die Ausbildung einer systemischen Infektion bei immunkompetenten Hunden dar (APPEL & BINN, 1987b).

Das Virus kann mithilfe von Nasen- oder Rachentupfern acht bis zehn Tage *post infectionem* nachgewiesen werden. Eine geringe Anzahl an Viren kann auch aus den umliegenden Lymphknoten isoliert werden. Eine Virämie und systemische Infektion erfolgt jedoch normalerweise beim immunkompetenten Hund nicht (APPEL & PERCY, 1970; ROSENBERG et al., 1971).

Eine alleinige Infektion mit dem CPIV führt nur zu milden klinischen Symptomen. Komplikationen können jedoch besonders bei jungen und immunsupprimierten Hunden durch Sekundärinfektionen entstehen, die in manchen Fällen zum Tod des Patienten führen (APPEL & BINN, 1987b).

Eine Isolation des Virus aus dem Respirationstrakt war vier, sechs und zwölf Wochen nach der Infektion in Studien nicht mehr möglich. Daher wird nicht von einer Persistenz des CPIV ausgegangen (APPEL & PERCY, 1970; ROSENBERG et al., 1971).

### 1.1.4. Klinische Symptome

Es ist nicht einfach, klinische Symptome einer CPIV-Infektion zuzuordnen, da es sich bei den meisten natürlichen Infektionen um Mischinfektionen handelt (BINN et al., 1967; APPEL & PERCY, 1970; ROSENBERG et al., 1971). Bei experimentell infizierten Hunden, die ausschließlich mit dem CPIV infiziert wurden, traten keine oder zwei bis acht Tage *post infectionem* nur milde Symptome auf, die weniger als sechs Tage andauerten (APPEL & BINN, 1987a). Bei Palpation des Larynx konnte in einzelnen Fällen Husten ausgelöst werden, außerdem trat bei manchen Tieren ein geringgradiger seröser Nasenausfluss auf (APPEL & PERCY, 1970; LAZAR et al., 1970).

Schwere klinische Symptome können beobachtet werden, wenn eine CPIV-Infektion mit einer weiteren viralen oder bakteriellen Infektion vergesellschaftet ist. Dieses Krankheitsbild wird dann als CIRD oder ITB bezeichnet (APPEL & PERCY, 1970; ROSENBERG et al., 1971; BINN et al., 1979).

Als Kardinalsymptom einer ITB mit CPIV-Beteiligung gilt ein trockener und keifender Husten, der wenige Tage bis wenige Wochen andauern kann. Zusätzlich können eine Pharyngitis und Tonsillitis sowie seröser Nasenausfluss auftreten. Eine milde Erhöhung der Körpertemperatur kann über ein bis zwei Tage kurz nach der Infektion gemessen werden. Ist das Immunsystem nicht in der Lage, die Infektion zu bekämpfen, kann sich eine Pneumonie entwickeln (CRANDELL et al., 1968; APPEL & BINN, 1987b).

#### **1.1.5. Diagnostik**

Da die klinischen Symptome vor der Ausbildung von Antikörpern auftreten, kann der Nachweis eines Antikörpertiter-Anstieges einen Hinweis auf eine CPIV-Infektion geben. Der Nachweis von Antikörpern aus einer einzelnen Serumprobe ist jedoch nicht aussagekräftig, da Tiere gegen das CPIV geimpft sein oder früher eine Infektion durchgemacht haben können. Somit muss ein Serumpaar zur Diagnosefindung abgenommen und auf einen Anstieg der Antikörper gegen das CPIV mittels eines enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA) untersucht werden (BITTLE & EMERY, 1970).

Der Virusnachweis mittels Zellkultur beinhaltet zwei Schritte: den Nachweis eines zytopathischen Effekts, einschließlich intrazytoplasmatischer Einschlusskörperchen und typischer Anordnung des Synzytiums, und die HämadSORption von Schweineerythrozyten (APPEL & BINN, 1987b; KARRON & COLLINS, 2007) oder eine Untersuchung der Kultur mit Immunfluoreszenz oder immunhistochemischen Verfahren (DAMIAN et al., 2005). Das CPIV ist ein instabiles Virus. Deswegen kann es bei der Virusisolierung durch Transport und Lagerung zu falsch-negativen Ergebnissen kommen (ELLIS & KRAKOWKA, 2012).

Eine sensitivere und schnellere diagnostische Methode zum Nachweis einer CPIV-Infektion stellt der Nachweis des Virusantigens aus Nasen- und Rachentupfern mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) dar (ERLES et al., 2004).

## 1.2. Canines Adenovirus Typ 2

Das canine Adenovirus (CAV) wird in zwei Typen eingeteilt: Das CAV-1, das die infektiöse canine Hepatitis verursacht, und das CAV-2, das die canine Laryngotracheitis hervorruft (COWDRY, 1930; GREEN et al., 1930; DITCHFIELD et al., 1962). Aufgrund der flächendeckenden Impfung hat das CAV in der Hundepopulation an Bedeutung verloren (DECARO et al., 2008).

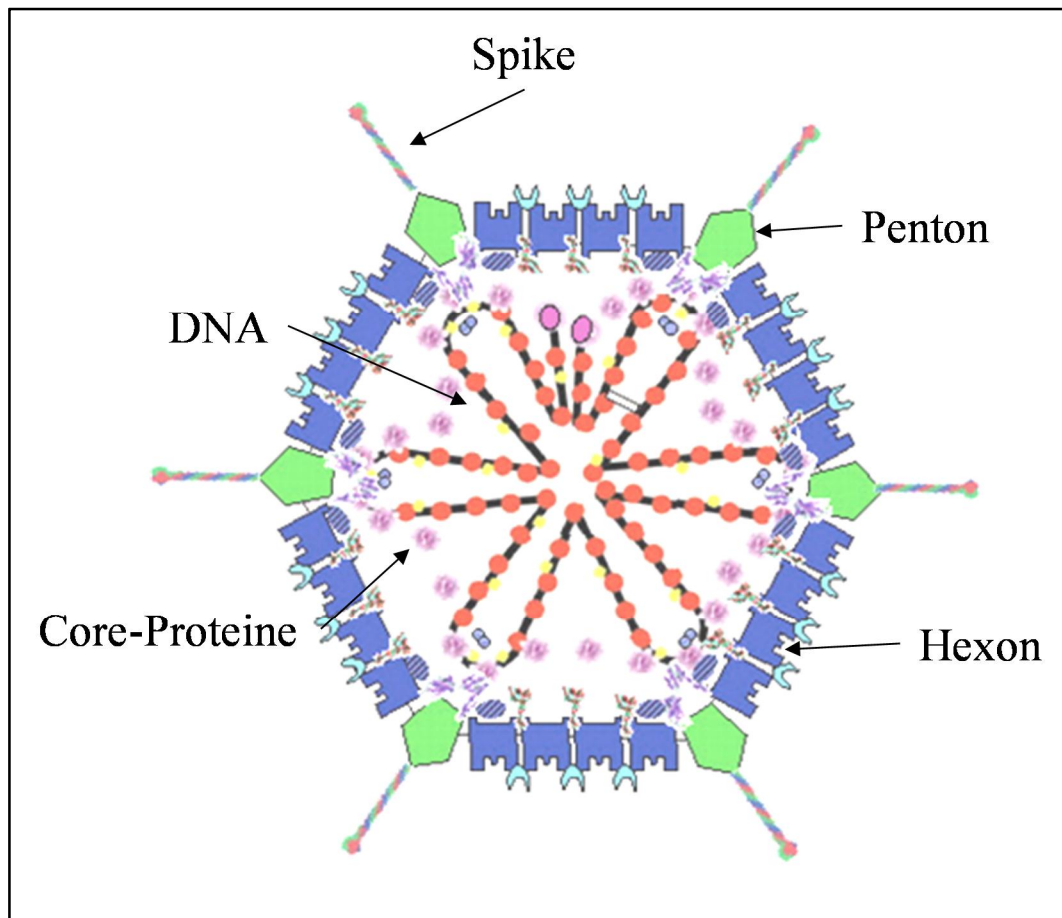
### 1.2.1. Ätiologie

CAV gehören zur Familie der *Adenoviridae* und zum Genus *Mastadenovirus* (MATTHEWS, 1982). CAV-1 und CAV-2 weisen antigenetische und genetische Gemeinsamkeiten auf (75%ige Übereinstimmung der Nukleotide) (MORRISON et al., 1997; DAVISON et al., 2003), unterscheiden sich jedoch in ihrem Hämagglutinationsmuster und in ihrem Zelltropismus. Das CAV-1 besitzt eine hohe Affinität zu Endothelzellen sowie zu hepatischen und renalen Parenchymzellen, während das CAV-2 sich bevorzugt im Respirationstrakt und in geringem Maße auch im Darmepithel vermehrt (SWANGO et al., 1970; APPEL et al., 1973).

Das CAV-2 wurde erstmals 1961 in Kanada bei Hunden, die an einer Laryngotracheitis erkrankt waren, nachgewiesen (DITCHFIELD et al., 1962). Der dabei isolierte Stamm, Toronto A26/61, wurde zunächst als eine abgeschwächte Form des CAV-1 angesehen. Erst später wurde es als Prototyp eines neuen CAV anerkannt und als CAV-2 bezeichnet (FAIRCHILD & COHEN, 1969).

CAV sind unbehüllte, doppelsträngige, lineare Desoxyribonukleinsäure-Viren (DNA-Viren) mit einem Durchmesser von 60 ó 90 nm, welche eine ikosaedrische Struktur mit 20 Seitenflächen und zwölf Ecken aufweisen. Das Kapsid besteht aus gut erkennbaren Proteinuntereinheiten, den sogenannten Kapsomeren. Diese Kapsomere umhüllen einen Kern, der aus der DNA und aus Arginin-reichen Proteinen besteht. Insgesamt besitzt das Virus 252 Kapsomere, davon sind 240 Hexone und zwölf Pentone. Die Hexone bestehen aus einem Trimer des Hexonproteins. An der Innenseite der Hexone befinden sich weitere Proteine, die mit Proteinen des Nukleoproteinkomplexes interagieren, der sich im Inneren befindet. Die Pentone befinden sich an den Ecken der ikosaedrischen Figur und tragen antennenartige Spikes, die eine Hämagglutinationsaktivität aufweisen und die Bindung zu den Wirtszellen herstellen. Am 5'-Ende der DNA befindet sich

das sogenannte Terminal-Protein (APPEL, 1987b). Das Virus ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung eines Adenovirus: die Core-Proteine interagieren mit den Kapsomeren (Penton und Hexon) des Kapsids (modifiziert nach RUSSELL, 2009).

### 1.2.2. Epidemiologie

Infektionen mit dem CAV-2 kommen bei verschiedenen Säugetierarten vor. Dabei besitzen Hunde, Rotfüchse, Wölfe und Kojoten eine erhöhte Empfänglichkeit (CARMICHAEL & GREENE, 1998). Antikörper werden weltweit gefunden. So konnten bei Rotfüchsen in Australien (ROBINSON et al., 2005), bei Füchsen auf den Kanalinseln und in Kalifornien (GARCELON et al., 1992), bei Meeressäugern und bei wildlebenden Landsäugetieren in Alaska und Kanada (PHILIPPA et al., 2004; BUREK et al., 2005) Antikörper gegen CAV-2 nachgewiesen werden.

Heutzutage kommen in Hundepopulationen CAV-2-Infektionen vor allem bei nicht immunkompetenten Hunden vor, das heißt bei Welpen mit einem nicht ausreichenden Immunschutz durch maternale Antikörper und bei adulten Tieren,

die keine vollständige und wirksame Impfung erhalten haben (APPEL, 1987a). Eine Infektion mit dem CAV-2 kann durch weitere Viren und Bakterien verkompliziert werden, so dass sich Symptome einer CIRD entwickeln können (BINN et al., 1967; BEMIS et al., 1977c; DECARO et al., 2004). Experimentell lassen sich bei ungeimpften Welpen respiratorische Infektionen mit dem CAV-2 auslösen, so dass dieses Virus zu den Primärerregern bei der Entwicklung des CIRD-Komplexes gehört (WRIGHT et al., 1974).

In Tabelle 2 werden die Ergebnisse der durchgeführten Studien zum Nachweis des CAV-2 in verschiedenen Ländern dargestellt.

**Tabelle 2: Ergebnisse der epidemiologischen Studien zum Nachweis des caninen Adenovirus Typ 2 in verschiedenen Hundepopulationen (PCR = Polymerase-Kettenreaktion).**

Land	Population	Anzahl/ Probenmaterial	PCR	Antikörper- nachweis	Literatur- angabe
<b>England</b>	Hunde mit Atemwegs- infektionen	29 Trachealspülproben 34 Lungenspülproben	0 % (0/29) 0 % (0/34)	-	Erles et al., 2004
<b>Japan</b>	Hunde mit Atemwegs- infektionen	68 Nasentupferproben	2,9 % (2/68)	-	Mochizuki et al., 2008
<b>Türkei</b>	ungeimpfte gesunde Hunde	94 Serumproben	-	87,2 % (82/94)	Gur & Acar, 2009

Neben diesen Studien liegen einzelne Fallberichte vor, in denen das CAV-2 bei Hunden mit respiratorischen Symptomen in Neuseeland (THAM et al., 1998), Österreich (CHVALA et al., 2007) und in Mexico (RODRIGUEZ-TOVAR et al., 2007) nachgewiesen werden konnte.

### 1.2.3. Pathogenese

Die Infektion erfolgt auf oronasalem Weg durch Inhalation von Viruspartikeln aus der Luft. Die Virusreplikation findet hierbei in nicht zilientragenden Epithelzellen der Bronchiolen und in oberflächlichen Zellen der Nasenschleimhaut, des Pharynx, der Krypten der Tonsillen, der Schleimhautzellen der Trachea, in peribronchialen Drüsen der Bronchien und in Typ-2-Alveolarepithelzellen statt. Abgesehen von diesen Orten der Replikation können CAV-2 in retropharyngealen und bronchialen Lymphknoten sowie in Magen und Darm nachgewiesen werden.

Der Peak der Virusreplikation wird drei bis sechs Tage *post infectionem* erreicht. Danach können im Serum und in der Bronchoalveolarlavage-Flüssigkeit (BALF) Antikörper nachgewiesen werden. Im Zuge der Antikörperbildung nimmt die Virusmenge rapide ab, so dass neun Tage nach der Infektion keine Viren mehr isoliert werden können. Respiratorische Symptome treten im Zusammenhang mit der Zerstörung der Epithelzellen in den Bronchien auf. Während der Virusreplikation sterben die infizierten Zellen ab und werden in das Lumen der Bronchien abgelöst (APPEL, 1987b).

Es gibt Hinweise, dass eine Infektion mit einem CAV zu einer Nekrose der Bronchien und Bronchioli führen kann und so die Bronchioli obliterieren können (CASTLEMAN, 1985). Eine Infektion der Typ-2-Alveolarzellen kann eine interstitielle Pneumonie verursachen (CURTIS et al., 1978; CASTLEMAN, 1985).

#### **1.2.4. Klinische Symptome**

Hunde, die nur mit dem CAV-2 infiziert sind, zeigen keine oder sehr milde Symptome. Histologisch jedoch sind Schädigungen der Lunge, die durch das Virus entstehen, nachweisbar (APPEL, 1987b).

Das CAV-2 verursacht eine milde Infektion des oberen Atmungstrakts, die vor allem durch einen stoßartigen Husten, Nasenausfluss und Anorexie gekennzeichnet ist (WRIGHT et al., 1974). Außerdem wird das Virus als ein ätiologischer Faktor bei der Entstehung einer CIRD angesehen (THAM et al., 1998). Das CAV-2 kann in seltenen Fällen auch eine Enteritis hervorrufen (HAMELIN et al., 1985; MACARTNEY et al., 1988). Es konnte auch aus dem Gehirn von Hunden mit neurologischen Symptomen isoliert werden (BENETKA et al., 2006).

#### **1.2.5. Diagnostik**

Eine zeitsparende, sensitive und spezifische Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde entwickelt, um den Erreger aus Konjunktivalabstrichen, Kot- und Urinproben nachweisen zu können. Diese PCR unterscheidet zwischen dem CAV-1 und dem CAV-2 (HU et al., 2001). Die PCR besitzt eine Sensitivität von 100 % und eine Spezifität von 90 % (YOON et al., 2010).

Ein Virusnachweis aus der Zellkultur mit Madin-Darby Hundenierenzellen

(Madin-Darby canine kidney cells ó MDCK) ist ebenfalls möglich, lässt jedoch keine Differenzierung zwischen dem CAV-1 und dem CAV-2 zu und ist ein langwieriges Verfahren (DECARO et al., 2008). Auf Grund der weitverbreiteten Impfung und einer Kreuzreaktion zwischen dem CAV-1 und dem CAV-2 kommt dem Antikörnernachweis zur Diagnose einer CAV-2-Infektion keine Bedeutung zu (MARUSYK & YAMAMOTO, 1971; APPEL et al., 1973).

### **1.3. Canines Influenzavirus**

Influenzaviren gelten weltweit als die wirtschaftlich bedeutendsten Viren bei Mensch, Schwein, Pferd und Geflügel (WRIGHT & WEBSTER, 2001). Bis vor kurzem wurde die Hundepopulation als nicht empfänglich für das Influenzavirus eingestuft (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007). In den achtziger Jahren konnten bei Hunden erstmals Antikörper gegen Influenzaviren nachgewiesen werden (BUONAVOGLIA & SALA, 1983).

#### **1.3.1. Ätiologie**

Das CIV ist ein behülltes RNA-Virus mit acht segmentierten, einzelsträngigen, negativ geladenen Genomen. Es gehört zur Familie der *Orthomyxoviridae* und wird anhand der zwei Oberflächenglykoproteine Hämagglutinin (H1 ó H16) und Neuraminidase (N1 ó N9) in Subtypen eingeteilt (FOUCHIER et al., 2005).

RNA-Viren sind aufgrund ihrer Replikation mithilfe von sehr fehleranfälligen RNA-Polymerasen in der Lage, relativ schnell neue Genvarianten zu bilden und somit neue Wirtsspezies zu vereinnahmen (DOMINGO & HOLLAND, 1997). Influenza-A-Viren haben als Hauptreservoir vor allem wildlebendes Wassergeflügel. Ausgehend von diesem Reservoir bietet sich dem Virus die Möglichkeit, auf den Menschen und auf andere Säugetierarten überzugehen und Epidemien oder Pandemien auszulösen (WEBSTER et al., 1992).

Zu den Faktoren, die die Pathogenität und die zwischenartliche Übertragung des Influenzavirus beeinflussen, gehören die spezifische Rezeptorbindung an der Zielzelle und die Spaltbarkeit des Hämagglutinins (MATROSOVICH et al., 2004; IBRICEVIC et al., 2006; PEIRIS et al., 2007), die Polymerase-vermittelte Kontrolle der Replikationsfähigkeit, die Neuraminidaseaktivität zur Spaltung des Rezeptors der infizierten Zelle zur Virusfreisetzung (NEUMANN & KAWAOKA, 2006) und eine nicht-strukturprotein-vermittelte Hemmung des

zelleigenen Abwehrmechanismus sowie die Kontrolle der Hyperaktivität von Zytokinen (CHEUNG et al., 2002; NEUMANN & KAWAOKA, 2006; PEIRIS et al., 2007).

Ein wichtiger Faktor für die interspezies-Übertragung des Influenza-A-Virus ist die Fähigkeit des Hämagglutininproteins, an einen bestimmten Rezeptor der Wirtszelle zu binden, bevor das Virus in die Zelle aufgenommen wird. Durch die speziesspezifische Verteilung der Bindungsstellen an den respiratorischen Epithelzellen kann das Influenzavirus zwischen den einzelnen Arten übertragen werden (MURANAKA et al., 2011). Durch Untersuchungen des Respirationstrakts von Pferden und Hunden entdeckte man, dass die Sialinsäurerezeptoren im Pferdeorganismus (*Maackia-amurensis*-Lektin (MAA), spezifisch für Sialinsäure-2,3-Galaktose (SA 2,3-Gal) (SUZUKI et al., 2000)), die für das Erkennen des equinen Influenzavirus (EIV) wichtig sind, ebenso im Respirationstrakt von Hunden vorkommen. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die Übertragung des EIV vom Pferd auf den Hund sein (DALY et al., 2008).

### 1.3.2. Epidemiologie

Der Begriff CIV wurde zum ersten Mal im Jahr 2004 im Zusammenhang mit der Isolierung eines H3N8-Virus aus einer Greyhound-Population in Florida/USA verwendet, das als A/Canine/Florida/43/2004 benannt wurde (CRAWFORD et al., 2005). Durch Sequenzanalyse des A/Canine/Florida/43/2004-Virus wurde festgestellt, dass zwischen diesem Virus und dem EIV eine 96%ige Übereinstimmung der Nukleotiden bestand, so dass vermutet wurde, dass das Influenzavirus durch eine transspezifische Übertragung von der Pferde- in die Hundepopulation eingeschleust worden war. In der Sequenzanalyse waren alle acht Gensegmente equinem Ursprungs (CRAWFORD et al., 2005). Jedoch konnten, im Vergleich zum EIV, vier Unterschiede in den Aminosäuren des Hämagglutininproteins festgestellt werden (N83S, W222L, I328T, N483T), so dass möglicherweise ein Gendrift für den Wechsel der Wirtsspezies verantwortlich war (CRAWFORD et al., 2005). Noch im selben Jahr wurden weitere respiratorische Infektionen, die mit dem ursprünglichen CIV-Stamm assoziiert waren, in den USA gefunden. Zu den betroffenen Staaten gehörten neben Florida auch Texas, Arkansas, Arizona, West Virginia, Kansas, Iowa, Colorado, Rhode Island, Wisconsin und Massachusetts (CRAWFORD et al.,



2005).

Im Unterschied zum EIV kann das CIV innerhalb einer Hundepopulation von Hund zu Hund übertragen werden, während das EIV nur vom Pferd auf den Hund übertragen werden kann. Beide Erreger sind aber in der Lage, beim Hund respiratorische Symptome auszulösen (JIRJIS et al., 2010; KIRKLAND et al., 2010; CRISPE et al., 2011).

In epidemiologischen Studien in den USA in den Jahren 2004 und 2005 wurden Antikörper aus gepaarten Serumproben von Hunden aus Beständen mit akuten respiratorischen Infektionen mittels Hämagglutinationshemmtest (HHT) und Serumneutralisationstest (SNT) untersucht. In der akuten Phase der Infektion (< sieben Tage) waren 56,4 % (53/94) im HHT und 58,3 % (56/96) im SNT Antikörper-positiv. Alle Hunde wiesen in der zweiten Serumprobe CIV-Antikörper auf (CRAWFORD et al., 2005). Außerdem wurden retrospektiv asservierte Serumproben von Greyhounds, die von 1984 ó 2004 gesammelt worden waren, auf Antikörper gegen das CIV und das EIV untersucht. In den Jahren 1984 ó 1998 wurden keine Antikörper nachgewiesen, jedoch wiesen 25,6 % (133/520) der Hunde aus den Jahren 1999 ó 2004 Antikörper auf (ANDERSON et al., 2012). Holt und Mitarbeiter (2010) detektierten bei 41,9 % (31/74) der klinisch gesunden Hunde aus einem Tierheim in Philadelphia CIV-Antikörper. Somit wird mittlerweile von einer Zirkulation des CIV in der amerikanischen Hundepopulation ausgegangen (HOLT et al., 2010).

Im Sommer 2007 konnte in Veterinärkliniken in Südkorea mittels Nasentupfern bei drei Hunden mit akut respiratorischen Infektionen ein H3N2-Virus isoliert werden, dessen Ursprung in der Vogelpopulation liegt. Außerdem gelang eine experimentelle Übertragung des isolierten H3N2-Virus auf Welpen, die daraufhin respiratorische Symptome entwickelten (SONG et al., 2008). Auch wurden H3N2-Viren und virusspezifische Antikörper bei gesunden Hunden nachgewiesen, die mit den zuvor experimentell infizierten Hunden in Kontakt standen, so dass das H3N2-Virus als ein zweites canines Influenzavirus angesehen wird (SONG et al., 2009).

2002 wurden in England Infektionen des Respirationstrakts bei Foxhounds beobachtet, die im Zusammenhang mit dem Ausbruch einer equinen Influenza bei Pferden stand. Die hier von zwei Hunden isolierten Influenzaviren zeigten eine

100%ige Übereinstimmung mit der Sequenz des EIV. Eine Zirkulation des Influenzavirus in der Hundepopulation, wie sie in den USA aufgetreten war, konnte nicht beobachtet werden, so dass angenommen wurde, dass alle erkrankten Hunde direkten Kontakt zu infizierten Pferden gehabt hatten (DALY et al., 2008). Eine Übertragung des EIV vom Pferd auf den Hund wurde auch bei einem Ausbruch der equinen Influenza 2007 in Australien nachgewiesen. Auch hier wurde ausschließlich eine Pferd-zu-Hund Übertragung beobachtet und keine weitere Zirkulation innerhalb der Hundepopulation nachgewiesen (KIRKLAND et al., 2010). Somit scheint die Verbreitung des für Hunde kontagiösen CIV momentan geografisch auf die USA und auf Korea beschränkt zu sein (DUBOVI, 2010).

### **1.3.3. Pathogenese**

Das CIV zählt zu den hochkontagiösen Viren. Vor allem Hunde, die in einer dichten Hundepopulation, wie zum Beispiel in Zwingern, Tierheimen oder Tierkliniken gehalten werden, sind einem erhöhten Infektionsdruck ausgesetzt. Empfänglich für das CIV sind Hunde jeglichen Alters und jeglicher Rasse unabhängig von ihrem Gesundheitsstatus (CRAWFORD, 2009).

Die Übertragung des CIV erfolgt durch den direkten Kontakt auf oronasalem Weg oder durch die Inhalation von ausgeschiedenen Viruspartikeln durch Husten oder Niesen. Die Ausscheidung des Virus erfolgt hierbei über das Nasensekret (JIRJIS et al., 2010). Die Inkubationszeit beträgt zwei bis vier Tage (CRAWFORD et al., 2005; ROSAS et al., 2008; DESHPANDE et al., 2009). Der Höhepunkt der Virusausscheidung wird während der präklinischen Inkubationszeit erreicht und fällt sehr rasch über die darauffolgenden Tage ab, bis es zur Einstellung der Virusausscheidung nach sieben bis zehn Tagen kommt (CRAWFORD et al., 2005; ROSAS et al., 2008; DESHPANDE et al., 2009). Ein Teil der Hunde entwickelt asymptomatische Infektionen, wobei diese Tiere das Virus trotzdem ausscheiden und somit als Infektionsquelle fungieren. Mit Beendigung der Virusausscheidung sind die Hunde nicht mehr infektiös (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGORN et al., 2008; ROSAS et al., 2008; DESHPANDE et al., 2009).

Die Virusreplikation findet in den Schleimhautepithelzellen, die den Respirationstrakt von der Nase bis zu den tieferen Luftwegen auskleiden, im

Drüsenepithel der Bronchiolen und in den pulmonären Makrophagen statt. Diese Virusvermehrung verursacht eine Nekrose der Epithelzellen und eine Zerstörung der natürlichen Abwehrbarriere des respiratorischen Epithels. Dies hat zur Folge, dass der Atmungstrakt für Sekundärinfektionen durch Bakterien anfälliger wird. Die primäre Virusinfektion initiiert eine starke neutrophile und monozytäre Entzündungsreaktion, die in Rhinitis, Tracheitis, Bronchitis und Bronchiolitis resultieren kann (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGORN et al., 2008).

#### **1.3.4. Klinische Symptome**

Alle Hunde, die mit dem Virus in Kontakt kommen, scheinen sich zu infizieren. Etwa 80,0 % der Hunde entwickeln klinische Symptome, während die restlichen 20,0 % subklinisch infiziert sind (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGORN et al., 2008).

Der Beginn der klinischen Symptomatik tritt bereits zwei bis drei Tage nach Infektion ein. Die häufigsten Symptome sind Lethargie, Anorexie, seröser Nasenausfluss, Niesen, Apathie, Augenausfluss und ein nicht-produktiver Husten (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGORN et al., 2008; ROSAS et al., 2008; DESHPANDE et al., 2009), wobei der Husten bis zu drei Wochen nach Infektion andauern kann (DESHPANDE et al., 2009; SONG et al., 2009). Produktiver Husten, mukopurulenter Nasenausfluss und Anzeichen einer Bronchopneumonie mit abnormalen Lungenauskultationsbefunden können sich nach Komplikation durch eine bakterielle Sekundärinfektion entwickeln (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGORN et al., 2008).

In der Regel verläuft eine Infektion mit dem CIV ohne Komplikationen, es sei denn, eine bakterielle Pneumonie tritt auf und führt zu einem schweren Krankheitsverlauf. Hunde mit einer Pneumonie entwickeln hohes Fieber, Inappetenz, produktiven Husten und eine erhöhte Atemfrequenz. Außerdem kann die Pneumonie zu Dyspnoe und schweren Hypoxien führen (CRAWFORD, 2009).

Bei experimentell infizierten Hunden, die eine Pneumonie entwickelten, wurden pulmonäre Kongestionen und Konsolidierungen sowie petechiale Blutungen beschrieben (CRAWFORD et al., 2005; DESHPANDE et al., 2009). Es wurde vermutet, dass vor allem Greyhounds für eine schwere Form der Pneumonie mit pulmonärer und thorakaler Blutung empfänglich seien (CRAWFORD et al., 2005;

YOON et al., 2005; DUBOVI & NJAA, 2008; PAYUNGPORN et al., 2008; CASTLEMAN et al., 2010).

### 1.3.5. Diagnostik

Der Nachweis des CIV kann sich schwierig gestalten, da das Virus in der Regel nur bis maximal sieben Tagen *post infectionem* nachweisbar ist. Das Probenmaterial (Nasen- und Rachentupfer) muss somit in der frühen Phase der Infektion, wenn die Virusausscheidung ihren Höchstpunkt erreicht hat, gewonnen werden (DESHPANDE et al., 2009; SONG et al., 2009).

Eine definitive Diagnose einer CIV-Infektion wird bei akut kranken Hunden durch den direkten Erregernachweis gestellt. Methoden, die zum Virusnachweis herangezogen werden können, sind der ELISA zum Nachweis des Virusantigens, die RT-PCR zum Nachweis der RNA und die Virusisolierung (CRAWFORD et al., 2005; DUBOVI & NJAA, 2008; PAYUNGPORN et al., 2008). Die RT-PCR stellt gegenüber den anderen beiden Methoden die sensitivere Diagnostikmöglichkeit dar, da nur eine geringe Menge an Viren im Probenmaterial vonnöten ist. Hierbei wird das Matrixgen als Zielgen verwendet (CRAWFORD et al., 2005). Zur Virusisolierung werden MDCK-Zellen oder embryonierte Hühnereier benutzt. Beide Virusisolierungsverfahren stellen spezifische, jedoch sehr zeitintensive Analyseverfahren zur Diagnosestellung dar (DUBOVI & NJAA, 2008). Nur bei 75,0 % der Hunde mit positiven PCR-Ergebnissen gelang in der Virusisolierung ein Virus-Nachweis, womit die PCR als die sensitivere Methode anzusehen ist (DUBOVI & NJAA, 2008). Der Antigen-ELISA stellt ein Analyseverfahren dar, das sich vor allem bei größeren Ausbrüchen von respiratorischen Infektionen innerhalb einer Hundepopulation eignet, da mithilfe dieses Testverfahrens zwar große Probenmengen kostengünstig untersucht werden können, die Sensitivität bei Hunden mit geringer Virusausscheidung jedoch nur 50 % beträgt (DUBOVI, 2010).

Der Nachweis eines Antikörperanstiegs ist vor allem dann hilfreich, wenn Hunde in einem Zeitraum vorgestellt werden, in dem ein direkter Erregernachweis nicht mehr möglich ist (> Tag 5) (DUBOVI & NJAA, 2008). Für den indirekten Erregernachweis stehen der Immunfluoreszenztest (IFT), der HHT, der Virusneutralisationstest (VNT) und der ELISA zur Verfügung (CRAWFORD et al., 2005; JIRJIS et al., 2010). Der ELISA stellt hierbei mit einer Sensitivität von

94 % und einer Spezifität von 99 % die beste Methode für den Antikörpernachweis dar (DE BENEDICTIS et al., 2010).

#### **1.4. Canines respiratorisches Coronavirus**

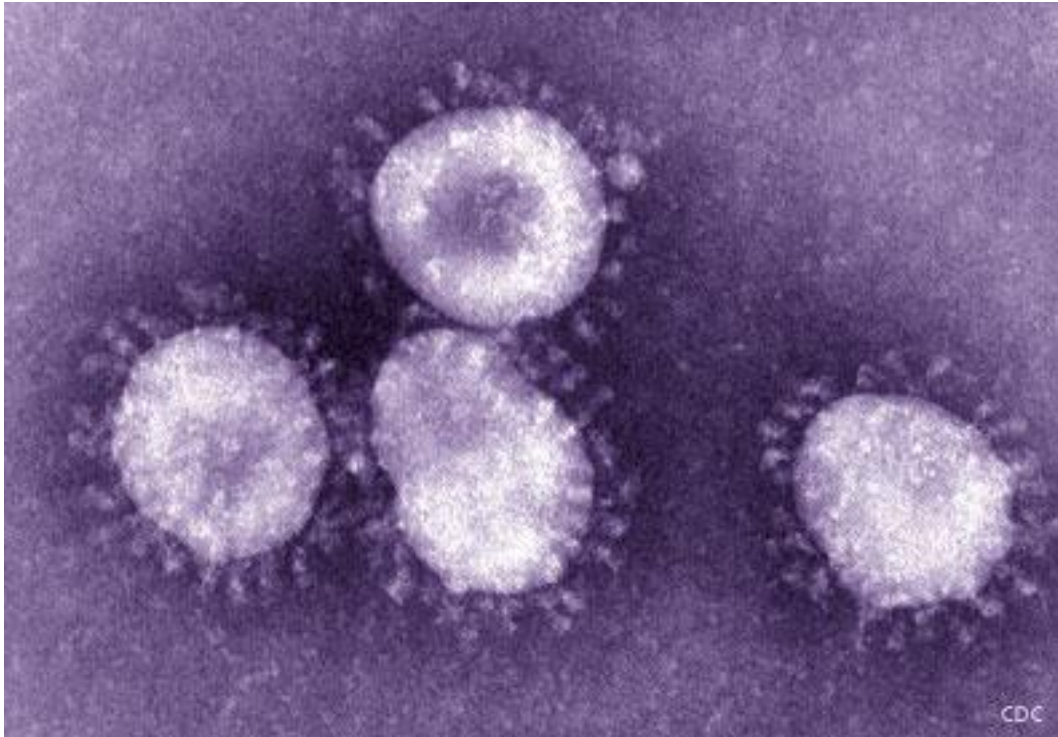
Das CRCoV ist ein relativ neues Pathogen, das 2003 erstmals aus dem Respirationstrakt von Hunden mit respiratorischen Symptomen isoliert werden konnte (ERLES et al., 2003). Seitdem wurde es weltweit bei Hunden mit akuten respiratorischen Infektionen nachgewiesen (YACHI & MOCHIZUKI, 2006; ERLES et al., 2007; MOCHIZUKI et al., 2008; AN et al., 2010a).

##### **1.4.1. Ätiologie**

Das CRCoV gehört zur Familie der *Coronaviridae* und zur Ordnung der *Nidovirales* (ENJUANES et al., 2000). Beim Hund wurden bis jetzt zwei verschiedene Coronaviren beschrieben: das canine enterale Coronavirus, das sich in die zwei Genotypen I und II einteilen lässt und zur Coronavirus Gruppe 1 gehört und das CRCoV, das der Coronavirus Gruppe 2 zugeordnet wird (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007).

Coronaviren sind behüllte RNA-Viren, die eine große Bandbreite an Vogel- und Säugetierarten infizieren und respiratorische und intestinale Erkrankungen verursachen können (ENJUANES et al., 2000). Coronaviren enthalten mit einer Länge von 27,6 bis 31,6 Kilobasen (kb) das größte einzelsträngige, positivgeladene, nichtsegmentierte RNA-Genom, das derzeit unter den RNA-Viren bekannt ist (GORBALENYA et al., 2006; SIDDELL & SNIJDER, 2008). Es kodiert einen Polymerase-Komplex und verschiedene Strukturproteine (Spike-Protein, Envelope-Protein, Membranprotein, Nukleokapsid-Protein) sowie Nicht-Strukturproteine (WEISS & NAVAS-MARTIN, 2005). Die Viren haben eine durchschnittliche Größe von 100 ó 140 nm. Innerhalb eines Virions ist die ssRNA in einem spiralförmigen Nukleokapsid eingebettet, das aus vielen Kopien des Nukleokapsid-Proteins besteht. Das Nukleokapsid ist ein wichtiger Faktor bei der Transkription und trägt zur Pathogenität der Viren bei. Die Lipid-Doppelschicht, die die Hülle des Virus bildet, beinhaltet drei Proteine: das Envelope-Protein und das Membranprotein, welche den Zusammenbau und die Freisetzung des Virus koordinieren und das Spike-Protein. Das Spike-Protein formt die typische kranzförmige Oberflächenstruktur des Coronavirus (Abbildung 3) und ist für die Anlagerung und den Eintritt in die Wirtszelle unter Verwendung der

virusspezifischen und wirtszellspezifischen Rezeptoren verantwortlich (GRAHAM & BARIC, 2010).



**Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Darstellung von Coronaviren; die kranzförmige Oberfläche wird durch Spike-Proteine gebildet (MURPHY, 1975).**

Zusätzlich besitzen Coronaviren der Gruppe 2 neben dem Spike-Protein ein zweites ähnliches Protein, das Hämagglutinin-Esterase-Protein, das zusammen mit dem Spike-Protein in die Virushülle integriert ist (YOKOMORI et al., 1989; KIENZLE et al., 1990). Über die Funktion des Hämagglutinin-Esterase-Proteins ist derzeit noch wenig bekannt. Möglicherweise spielt es eine Rolle bei der Zellfusionierung von Virus und Wirtszelle und ist für den Zelltropismus des Virus verantwortlich (WEISS & NAVAS-MARTIN, 2005).

#### **1.4.2. Epidemiologie**

Über die letzten 30 Jahre entwickelten sich infolge von artenübergreifenden Infektionen des Coronavirus sowie Veränderungen des Zelltropismus bedeutende neue tierische und menschliche Krankheiten. Diese werden durch das bovine Coronavirus (BCoV), die humanen Coronaviren OC43 und 229E (HCoV-OC43, HCoV-229E), das canine Coronavirus, das feline Coronavirus, das porcine Coronavirus und das transmissible Gastroenteritis-Virus der Schweine verursacht (VIJGEN et al., 2005; VIJGEN et al., 2006; JIN et al., 2007; ALEKSEEV et al.,

2008; LORUSSO et al., 2008; LORUSSO et al., 2009; PERLMAN & NETLAND, 2009; PFEFFERLE et al., 2009). Durch den Ausbruch der schweren akuten Atemwegssyndrom-Epidemie (severe acute respiratory syndrome ó SARS) beim Menschen im Jahr 2002/2003, die ihren Ausgang in Asien in der südchinesischen Provinz Guangdong hatte, gewannen Coronaviren an Bedeutung (GUAN et al., 2003).

Das CRCoV wurde 2003 in Großbritannien erstmals aus Trachea und Lungengewebe eines Hundes nachgewiesen (ERLES et al., 2003). Durch eine phylogenetische Analyse der Polymerase wurde das CRCoV der Coronavirus Gruppe 2 zugewiesen, zusammen mit dem BCoV und dem HCoV-OC43 (ERLES et al., 2003). Sequenzanalysen des Spike-Protein-kodierenden Gens ergaben eine große genetische Ähnlichkeit mit dem BCoV (97,3 %) und dem HCoV-OC43 (96,9 %) (ERLES et al., 2003; LORUSSO et al., 2009). Diese Übereinstimmung deutet auf einen gemeinsamen Vorfahren für diese drei Viren hin (VIJGEN et al., 2005). Eine große genetische Ähnlichkeit des CRCoV und BCoV lässt spekulieren, dass eine Übertragung ohne Rekombination des BCoV von der Kuh auf den Hund erfolgt ist (ERLES et al., 2007). Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass das BCoV vom Rind auf den Hund übertragbar ist und dass daraufhin innerhalb der Hundepopulation eine Hund-zu-Hund Übertragung erfolgen kann. Das Virus löst im Hund allerdings keine klinische Erkrankung aus (KANESHIMA et al., 2007).

Das CRCoV scheint weltweit verbreitet zu sein. Eine Studie in Großbritannien untersuchte bei 119 Hunden aus einer Hundepopulation, die nach der Schwere ihrer respiratorischen Symptome in vier Gruppen eingeteilt wurden, Lungenspül- und Trachealspülproben mittels RT-PCR auf CRCoV (Tabelle 3). Von 111 Hunden wurden Serumpaare auf CRCoV-Antikörper untersucht. Insgesamt 21,0 % (17/81) der Hunde mit respiratorischen Symptomen und 56,7 % (17/30) der symptomfreien Hunde hatten am Tag der Aufnahme in den Zwinger CRCoV-Antikörper. Nach 21 Tagen konnten in der gesamten Hundepopulation bei fast allen Hunden (110/111) Antikörper gegen das CRCoV nachgewiesen werden, was für eine hohe Kontagiosität des Virus spricht (ERLES et al., 2003).

Weitere Untersuchungen zum CRCoV-Nachweis wurden in Hundepopulationen in Korea, Italien und Japan durchgeführt (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Ergebnisse der epidemiologischen Studien zum Nachweis des caninen respiratorischen Coronavirus in verschiedenen Hundepopulationen (PCR = Polymerase-Kettenreaktion).**

Land	Population	Anzahl/ Probenmaterial	PCR	Literatur- angabe
<b>Großbritannien</b>	Hunde mit respiratorischen Symptomen	119 Trachealspülproben 119 Lungenspülproben	26,9 % (32/119) 16,8 % (20/119)	Erles et al., 2003
<b>Italien</b>	unselektierte euthanasierte Hunde	109 Lungenspülproben	0,9 % (1/109)	Decaro et al., 2007
<b>Korea</b>	euthanasierte oder verstorbene Hunde mit respiratorischen, gastrointestinalen, dermatologischen oder keinen Symptomen	109 Tracheal- und Lungenspülproben	2,8 % (3/109)	An et al., 2010a
<b>Japan</b>	Hunde mit respiratorischen und/oder gastrointestinalen Symptomen	96 Tupferproben aus Rachen, Nasenhöhle, Konjunktiven und Rektum	2,1 % (2/96)	Yachi & Mochizuki, 2006

Studien haben ergeben, dass in vielen Ländern eine hohe Antikörperprävalenz gegen das CRCoV in Hundepopulationen nachweisbar ist. In Tabelle 4 werden die Ergebnisse der epidemiologischen Studien in Italien, Neuseeland, Korea, den USA, Kanada, Großbritannien und Irland aufgeführt.

**Tabelle 4: Ergebnisse der epidemiologischen Studien zum Nachweis caniner respiratorischer Coronavirus-Antikörper in verschiedenen Hundepopulationen.**

Land	Population	Anzahl	Antikörper- nachweis	Literatur- Angabe
<b>Italien</b>	unselektierte Hundepopulation	590 Serumproben	20,0 % (118/590)	Priestnall et al., 2007
<b>Großbritannien</b>	unselektierte Hundepopulation	830 Serumproben	36,0 % (299/830)	Priestnall et al., 2006
<b>Irland</b>	unselektierte Hundepopulation	66 Serumproben	30,3 % (20/66)	Priestnall et al., 2006
<b>Neuseeland</b>	unselektierte Hundepopulation	251 Serumproben	29,0 % (73/251)	Knesl et al., 2009
<b>Korea</b>	unselektierte Hundepopulation	483 Serumproben	12,8 % (62/483)	An et al., 2010b
<b>USA</b>	unselektierte Hundepopulation	956 Serumproben	54,5 % (521/956)	Priestnall et al., 2006
<b>Kanada</b>	unselektierte Hundepopulation	44 Serumproben	59,1 % (26/44)	Priestnall et al., 2006



### 1.4.3. Pathogenese

Die Übertragung des CRCoV erfolgt vor allem durch die Aufnahme von Virus-kontaminiertem respiratorischem Sekret. Eine Infektion über den fäkal-oralen Übertragungsweg scheint ebenfalls möglich zu sein (ERLES & BROWNLIE, 2008).

Die Virusreplikation des CRCoV findet im Epithel des Respirationstrakts statt und führt dort zur Beeinträchtigung des mukoziliären Systems, wodurch es zu Sekundärinfektionen durch andere Erreger kommen kann (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007). Durch den erleichterten Eintritt von Sekundärerregern in den Respirationstrakt kann es im Folgenden zu einer schwereren klinischen Verlaufsform im Rahmen des CIRDC-Komplexes kommen (ERLES & BROWNLIE, 2008).

Eine Infektion mit dem CRCoV kann bei Hunden jeglichen Alters auftreten. Hunde, die jünger als ein Jahr alt waren, waren allerdings häufiger Antikörper-negativ als ältere Hunde (PRIESTNALL et al., 2006; PRIESTNALL et al., 2007; ERLES & BROWNLIE, 2008). Bis zu einem Alter von einem Jahr konnte in Studien ein Anstieg der CRCoV-Antikörper verzeichnet werden. Danach scheint ein Plateau erreicht zu sein. Möglicherweise hat dies mit der Tatsache zu tun, dass die Hunde mit zunehmendem Alter einen vermehrten Hundekontakt haben und somit einer höheren Virusexposition ausgesetzt sind (ERLES & BROWNLIE, 2008). Es ist nicht geklärt, wie lange Antikörper nach einer Infektion bestehen bleiben. Allerdings konnte ein Absinken des Antikörpertiters bei Hunden nach weniger als einem Jahr *post infectionem* beobachtet werden (ERLES & BROWNLIE, 2005).

Da das CRCoV einen ähnlichen Zelltropismus besitzt wie das BCoV, kann neben dem Respirationstrakt auch der Gastrointestinaltrakt betroffen sein (MITCHELL et al., 2009). In Studien konnte gezeigt werden, dass das CRCoV auch in Milz, Mesenteriallymphknoten und Darm nachweisbar ist (KANESHIMA et al., 2006; YACHI & MOCHIZUKI, 2006; DECARO et al., 2007).

### 1.4.4. Klinische Symptome

Erles und Mitarbeiter (2007) konnten nachweisen, dass eine alleinige Infektion mit dem CRCoV eine asymptomatische subklinische Infektion oder nur sehr

milde respiratorische Symptome verursacht. Eine Koinfektion mit einem weiteren Erreger kann zu einem deutlich schwereren Krankheitsverlauf führen (ERLES et al., 2007).

Durch Studien konnte belegt werden, dass CRCoV-assoziierte respiratorische Infektionen nicht immer mit der Ausbildung von Symptomen einhergehen. Im Rahmen einer einjährigen Studie wurden zwei Hundepopulationen, die in Zwingern gehalten wurden, auf die Ausbildung einer CIRD hin untersucht. In beiden Populationen konnten Episoden von respiratorischen Symptomen dokumentiert werden. Eine Antikörperanalyse ergab, dass von 28 Hunden, die ursprünglich einen negativen CRCoV-Antikörpernachweis hatten, 57,1 % (16/28) der Hunde nach einer überstandenen CIRD-Episode Antikörper gegen das CRCoV aufwiesen. Ebenso konnten bei 52,8 % (19/36) der gesunden Hunde Antikörper nachgewiesen werden. Dies beweist wiederum, dass eine CRCoV-Infektion auch asymptomatisch verlaufen kann (ERLES & BROWNLIE, 2005).

#### **1.4.5. Diagnostik**

Mögliche direkte Nachweismethoden für das CRCoV sind die Virusisolierung und der Nachweis der viralen RNA mittels RT-PCR (ERLES et al., 2003; ERLES et al., 2007). Molekulare Untersuchungsmethoden wie die RT-PCR bieten den Vorteil eines schnellen Erregernachweises bei hoher Sensitivität und Spezifität (WANG et al., 1999; TANG, 2003). Die RT-PCR hat als Zielgen entweder das Spike-Glykoprotein-Gen (ERLES et al., 2003) oder das Hämagglutinin-Esterase-Gen (YACHI & MOCHIZUKI, 2006). Erles und Mitarbeiter (2003) verglichen die Virusisolierung mit der RT-PCR (allerdings nur bei wenigen Hunden) und kamen zu dem Ergebnis, dass drei von fünf in der RT-PCR positiv getesteten Proben in der Virusisolation einen negativen Nachweis aufwiesen (ERLES et al., 2003).

Für den Antikörpernachweis kann der ELISA, der IFT oder der VNT eingesetzt werden. Priestnall und Mitarbeiter (2006) verglichen den ELISA mit dem IFT und konnten für den ELISA eine Sensitivität von 96 % und eine Spezifität von 97 % ermitteln (PRIESTNALL et al., 2006). Die Sensitivität und Spezifität des ELISA im Vergleich zum VNT lag in einer weiteren Studie bei 100 % und 35 % (PRATELLI et al., 2002). Um eine akute CRCoV-Infektion nachweisen zu können, sollten gepaarte Serumproben auf einen Anstieg der CRCoV-Antikörper

hin untersucht werden, da Antikörper nach einer überstandenen Infektion bis zu einem Jahr im Körper persistieren können (ERLES & BROWNLIE, 2005).

### **1.5. Canines Herpesvirus**

Auch das CHV konnte bei Hunden mit Atemwegsinfektionen isoliert werden (BINN et al., 1979). Von mehreren Autoren wird vermutet, dass das Virus als Auslöser von akuten respiratorischen Symptomen als Primärerreger eine Rolle spielen könnte (ERLES et al., 2004; KAWAKAMI et al., 2010).

#### **1.5.1. Ätiologie**

Das CHV gehört zur Ordnung *Herpesvirales* der Familie *Herpesviridae*, zur Subfamilie *Alphaherpesvirinae* und zum Genus *Varicellovirus* (VAN REGENMORTEL et al., 2000). Die Alphaherpesviren werden als Viren klassifiziert, die kein variables Wirtsspektrum aufweisen, einen relativ kurzen Reproduktionszyklus besitzen, rasches Wachstum in Zellkulturen zeigen, eine effiziente Zerstörung der infizierten Zellen bewirken und die Eigenschaft besitzen, eine latente Infektion in sensorischen Ganglien durchzuführen (ROIZMANN et al., 1992).

Das CHV besteht aus einer linearen doppelsträngigen DNA, die sich zu einem Ring umformen kann und aus einem ikosadeltahedralem Kapsid, das im Durchmesser 100 ± 110 nm beträgt. Das Kapsomer des Virus beinhaltet zwölf fünfstrahlige und 150 sechsstrahlige Kapsomere. Außerdem besitzt das Virus ein amorphes, manchmal auch asymmetrisches Material, das das Kapsid umgibt und das Tegument bildet. Weiterhin besteht es aus einer Membran, die die Hülle des Virions bildet und Glykoproteine als Spikes integriert hat, die über die Oberfläche herausragen (ROIZMANN et al., 1992). Studien ergaben eine enge antigenetische Verwandtschaft zwischen dem CHV, dem feline Herpesvirus und dem phociden Herpesvirus-1 (ROTA & MAES, 1990; WILLOUGHBY et al., 1999; MARTINA et al., 2003).

#### **1.5.2. Epidemiologie**

Das Wirtsspektrum des CHV ist auf domestizierte und wildlebende Kaniden beschränkt (CARMICHAEL et al., 1965b; GREENE & CARMICHAEL, 2006). Das Virus wurde 1965 erstmals als Auslöser eines septikämisch-hämorrhagischen Krankheitskomplexes bei neugeborenen Hundewelpen beschrieben

(CARMICHAEL et al., 1965a; SPERTZEL et al., 1965; STEWART et al., 1965). Es ist weltweit verbreitet und konnte bei Hunden in den USA (CARMICHAEL et al., 1965b), Europa (DE RATULD & WERNER, 1965; CORNWELL et al., 1966; PRYDIE et al., 1966; DE RATULD & WERNER, 1968), Japan (MOTOHASHI & TAJIMA, 1966), Australien (GELDARD et al., 1971; WATT et al., 1974) und Afrika (BARTSCH et al., 1974) isoliert werden.

Die Rolle des CHV im Krankheitskomplex der CIRD ist bisher noch nicht geklärt. Wright und Mitarbeiter (1970) konnten das CHV 1970 erstmals aus Lunge und Trachea eines Hundes isolieren, der unter akuten respiratorischen Symptomen litt (WRIGHT et al., 1970). Durch experimentell induzierte Monoinfektionen mit CHV konnten bei adulten Hunden milde klinische Symptome einer Rhinitis und Pharyngitis (APPEL et al., 1969) oder eine CIRD-ähnliche Symptomatik ausgelöst werden (KARPAS et al., 1968). Von einigen Autoren wird diskutiert, ob eine primäre virale oder bakterielle Infektion des Respirationstrakts das CHV in latent infizierten Hunden reaktivieren und somit die Primärerkrankung potenzieren könnte (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007), woraufhin diesen Patienten dann fälschlicherweise eine CHV-induzierte schwere klinische Symptomatik zugesprochen wird (ERLES et al., 2004). Die Pathogenität des CHV wird somit wahrscheinlich signifikant durch Faktoren beeinflusst, die auf das Wirtstier einwirken, wie Alter, Trächtigkeit, Stress, immunsuppressive Therapie und begleitende Krankheiten (GERBER et al., 1977; BUJKO et al., 1988; OKUDA et al., 1993b; CARMICHAEL & GREENE, 1998). Somit wird das CHV zum jetzigen Zeitpunkt nicht als primärer Auslöser des CIRD-Komplexes betrachtet (FORD, 2006; GREENE & CARMICHAEL, 2006).

In den letzten Jahren wurden in England, Holland, Belgien und Deutschland Prävalenzstudien zum Nachweis von CHV-Antikörpern in Hundepopulationen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt. In einer Studie in Italien konnte bei gesunden, in Zwingern gehaltenen Hunden eine Antikörperprävalenz von 27,9 % festgestellt werden, während die Prävalenz bei im Haus gehaltenen Hunden bei 3,1 % lag (SAGAZIO et al., 1998). Erles und Mitarbeiter (2004) untersuchten 211 Tracheal- und 104 Lungenspülproben von 211 euthanasierten Hunden mittels PCR auf CHV. Ein positiver Virusnachweis erfolgte aus 12,8 % (27/211) der Trachealspülproben und 9,6 % (10/104) der Lungenspülproben, von denen 21,6 % (8/37) der Tiere keine respiratorischen,

13,5 % (5/37) milde, 37,8 % (14/37) moderate und 27,0 % (10/37) schwere respiratorische Symptome zeigten (ERLES et al., 2004). In Japan entwickelten sich bei 15 Hunden während eines Klinikaufenthalts akute respiratorische Symptome. Von zehn infizierten Hunden wurden Nasen- und Rachentupfer gesammelt und mittels Virusisolierung und PCR auf CPIV, CAV, CRCoV, CHV und CDV untersucht. Bei 40,0 % (4/10) der Hunde konnte in der Viruskultur das CHV festgestellt werden, und alle zehn Hunde wiesen in der PCR ein CHV-positives Ergebnis auf. Weitere respiratorische Erreger konnten nicht nachgewiesen werden (KAWAKAMI et al., 2010).

**Tabelle 5: Ergebnisse der epidemiologischen Studien zum Nachweis von caninen Herpesvirus-Antikörpern in verschiedenen Hundepopulationen.**

Land	Population	Anzahl	Antikörper-nachweis	Literatur-Angabe
England	gesunde Hunde	325 Serumproben	76,0 % (247/325)	Reading & Field, 1998
Holland	gesunde Hunde	224 gepaarte Serumproben	39,3 % (88/224)	Rijsewijk et al., 1999
Belgien	gesunde Hunde	647 Serumproben	45,8 % (296/647)	Ronsse et al., 2002
Deutschland	gesunde Hunde	1666 Serumproben	18,8 % (313/1666)	König et al., 2004

### 1.5.3. Pathogenese

Eine CHV-Infektion erfolgt hauptsächlich über den oronasalen und den venerischen Übertragungsweg. Hierbei ist ein direkter Kontakt zum infizierten Hund notwendig, da das CHV in der Umwelt rasch inaktiviert wird. Eine transplazentare Übertragung des CHV oder eine Infektion im Geburtskanal ist ebenfalls möglich und kann zum Absterben des Fötus oder zum Welpensterben führen. Die Virusausscheidung findet über den Respirations- und Genitaltrakt von akut infizierten Hunden statt (POSTE & KING, 1971; HASHIMOTO et al., 1982; HASHIMOTO et al., 1983b; CARMICHAEL & GREENE, 1998).

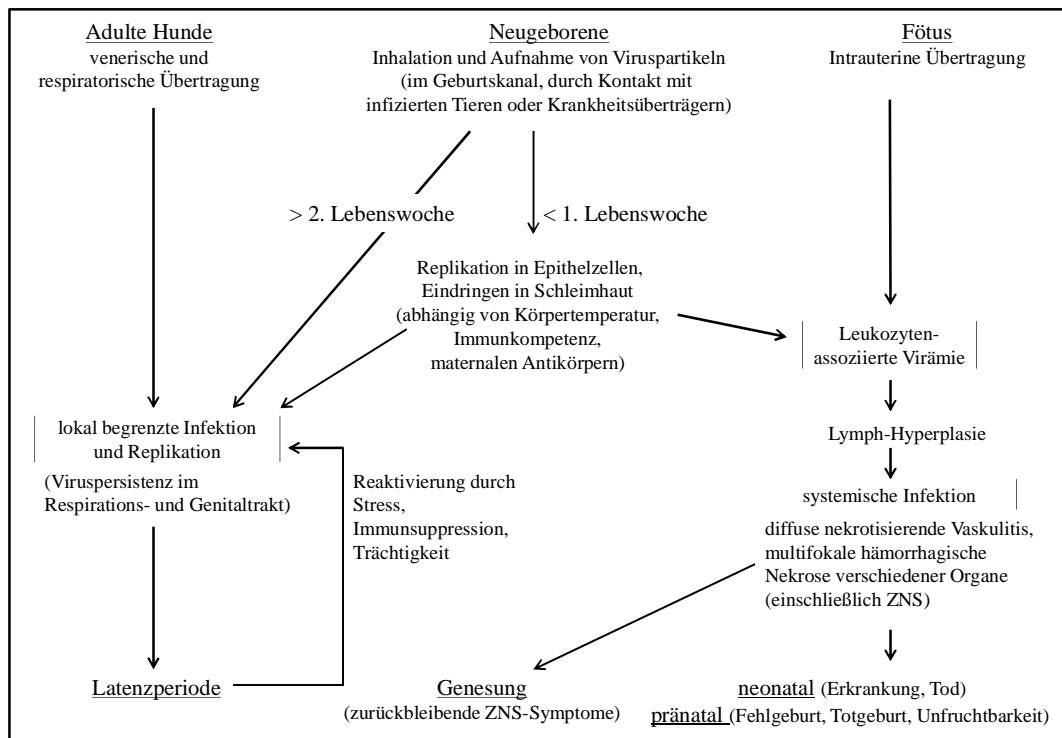
In Abbildung 4 sind die einzelnen Infektionswege in Abhängigkeit vom Alter der infizierten Hunde dargestellt. Die Virusreplikation in adulten Hunden findet vor allem im Genitaltrakt, dem Nasopharynx, den Tonsillen, den retropharyngealen und bronchialen Lymphknoten und gelegentlich der Lunge statt (BURR et al., 1996). In Hundewelpen, die sich in der ersten Lebenswoche mit dem CHV

infizieren, erfolgt die Virusreplikation zunächst in der Nasenschleimhaut, im Pharynx und den Tonsillen. Es entstehen kleine lokale nekrotische Herde mit einer vaskulären Zerstörung. Danach erfolgt eine zellassozierte Virämie in Makrophagen und Lymphozyten. Das Virus erreicht hierbei vor allem lymphatisches Gewebe, aber auch Leber, Nieren, Lunge und zentrales Nervensystem (ZNS) (CARMICHAEL, 1970). Das Resultat sind fokale Nekrosen in allen betroffenen Organen. Die Inkubationszeit beträgt in der Regel sechs bis zehn Tage. Der Tod tritt normalerweise im Zeitraum von wenigen Tagen bis einer Woche ein. Die Mortalitätsrate bei Welpen beträgt nahezu 100 % (CARMICHAEL et al., 1965a; CARMICHAEL, 1970; PERCY et al., 1970; DECARO et al., 2008).

Hunde, die zum Zeitpunkt der CHV-Infektion älter als zwei Wochen sind, sind in der Regel resistent oder entwickeln nur milde Krankheitssymptome. Für die Entwicklung der Resistenz gegen das CHV zwischen der ersten und zweiten Lebenswoche sind möglicherweise der zu diesem Zeitpunkt bessere Immunstatus und eine verbesserte Temperaturregulation verantwortlich. Das optimale Wachstum des CHV in Zellkulturen konnte bei einer Temperatur zwischen 35,0 und 36,0 Grad Celsius (°C) beobachtet werden. Die rektale Körpertemperatur von ausgewachsenen Hunden liegt zwischen 38,5 °C und 39,5 °C und somit über dem Wachstumsoptimum des CHV. Die Körpertemperatur von Neugeborenen ist in der Regel 1,0 °C bis 1,5 °C niedriger und bietet somit dem Virus eine bessere Möglichkeit zur Vermehrung (CARMICHAEL et al., 1969; CARMICHAEL & GREENE, 1998). Das pathogene Potenzial des CHV scheint somit vom Alter des Wirtstiers abhängig zu sein (GREENE & CARMICHAEL, 2006).

Nachdem die Hunde eine symptomatische oder asymptomatische Infektion mit dem CHV überstanden haben, bleiben sie latente Virusträger und können den Erreger in unvorhersehbaren Intervallen über einen Zeitraum von mehreren Monaten oder Jahren ausscheiden. Die Reaktivierung des Virus erfolgt durch Stresssituationen (Trächtigkeit, Wechsel der vertrauten Umgebung) oder Immunsuppression, wie durch die Gabe von Glukokortikoiden (OKUDA et al., 1993b; OKUDA et al., 1993a). Das Virus zieht sich während der latenten Phase in das Trigeminusganglion zurück, aber auch andere Orte, wie das Lumbosakralganglion, die Tonsillen und die Parotis konnten als Aufenthaltsort des latenten Virus identifiziert werden (OKUDA et al., 1993a; BURR et al., 1996;

CARMICHAEL & GREENE, 1998; MIYOSHI et al., 1999).



**Abbildung 4: Pathogenese der caninen Herpesvirus-Infektion (modifiziert nach CARMICHAEL & GREENE, 1998).**

#### 1.5.4. Klinische Symptome

Erfolgt die Infektion transplazentar in der Mitte oder der späten Trächtigkeitsphase, kommt es zum Abort mumifizierter oder toter Föten, zur Geburt unreifer oder toter Welpen oder zur Geburt schwacher oder verkümmerter Welpen (CARMICHAEL & GREENE, 1998). Eine CHV-Infektion führt in der Regel bei neugeborenen Hundewelpen, die keine ausreichende maternale Immunität aufweisen, in der ersten Lebenswoche zum Tod. Die Erkrankungsdauer beträgt ein bis drei Tage. Typische Symptome sind kontinuierliche Lautäußerungen, Anorexie, Dyspnoe, abdominaler Schmerz, Desorientierung und gelb-grünlicher Durchfall, wobei die Körpertemperatur nicht erhöht, sondern eher erniedrigt ist. Seröser oder blutiger Nasenausfluss und petechiale Blutungen in die Maulschleimhaut können ebenfalls auftreten (DECARO et al., 2008).

Infizieren sich die Welpen erst in der zweiten oder dritten Lebenswoche, verläuft die Infektion meist asymptomatisch. In manchen Fällen konnten jedoch ZNS-Symptome, wie Blindheit und Taubheit, beobachtet werden (CARMICHAEL, 1970). Ältere Welpen oder erwachsene Hunde, die mit dem CHV infiziert

wurden, zeigten keine oder nur sehr milde Symptome einer Infektion der oberen Atemwege, wie eine Rhinitis mit serösem bis mukopurulentem Nasenausfluss, der selten auch blutig sein kann (MOTOHASHI & TAJIMA, 1966; KARPAS et al., 1968; APPEL et al., 1969; THOMPSON et al., 1972).

Primäre genitale Infektionen bei adulten Hündinnen können mit lymphfollikulären Läsionen und vaginaler Hyperämie assoziiert sein. Männliche Hunde zeigen ähnliche Läsionen an der Basis des Penis und Präputiums (POSTE & KING, 1971; HILL & MARE, 1974; HASHIMOTO et al., 1983a; DECARO et al., 2008).

#### **1.5.5. Diagnostik**

Die Diagnose einer CHV-Infektion kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Mittels Virusisolierung können typische Plaque-Formationen auf Agarose- oder Methylzelluloseuntergrund und intranukleäre Einschlusskörperchen dargestellt werden (BINN et al., 1970a).

Kürzlich wurde der Nachweis von Virus-DNA mittels real-time PCR aus verschiedenen Gewebeproben und Körperflüssigkeiten beschrieben (DECARO et al., 2010). Der Vorteil der real-time PCR gegenüber der klassischen PCR liegt in einer kürzeren Bearbeitungszeit der Proben, einem vermindertem Kontaminationsrisiko und einer höheren Spezifität aufgrund der zusätzlichen Hybridisierung der Proben (DECARO et al., 2010).

CHV-Antikörper können mittels VNT (CARMICHAEL, 1970) oder ELISA (TAKUMI et al., 1990) nachgewiesen werden. Der Antikörpernachweis stellt zum Nachweis einer akuten CHV-Infektion jedoch keine sinnvolle Methode dar, da Antikörper nach einer Infektion bis zu zwei Jahre nachweisbar sind (CARMICHAEL & GREENE, 1998).

#### **1.6. Canines Staupevirus**

Das CDV verursacht die kanine Staupe, die zu den hochkontagiösen systemischen viralen Infektionskrankheiten gehört und sich in gastrointestinalen, respiratorischen und neurologischen Symptomen manifestieren kann (EKKOMMONEN et al., 1997; GAMIZ et al., 2011). Die Infektion kann sowohl akut als auch subakut verlaufen und geht mit einer hohen Mortalitätsrate einher. Karnivoren weltweit sind für eine Staupeinfektion empfänglich (APPEL, 1987c).



### 1.6.1. Ätiologie

Das CDV gehört zur Subfamilie *Paramyxovirinae* der Familie *Paramyxoviridae* und ist ein Vertreter des Genus *Morbilivirus* (GREENE & APPEL, 2006). Das CDV besitzt einen relativ großen Durchmesser von ungefähr 150 ó 250 nm und besteht aus einer behüllten negativ geladenen ssRNA. Diese ist in ein spiralförmig symmetrisches Nukleokapsid eingeschlossen. Das Nukleokapsid wird von einer Lipidhülle umgeben, die von der Wirtszelle selbst entstammt. Das RNA-Genom kodiert sechs Strukturproteine, die gemeinsam das Nukleokapsid bilden: zwei Glykoproteine (Fusions- und Hämagglutinationsprotein), zwei für die Transkription zuständigen Proteine (Phospho- und  $\beta$ -Large $\alpha$ -Protein), das Matrixprotein, das für die Stabilisierung der Lipidmembran zuständig ist, und das Nukleokapsidprotein, das für die Einkapselung des RNA-Genoms verantwortlich ist (SIDHU et al., 1993; VAN REGENMORTEL et al., 2000).

Das Hämagglutinationsprotein spielt eine Schlüsselrolle bei der Infektion der Wirtszellen (APPEL, 1987c). Es nimmt über Rezeptoren der Wirtszelle den ersten Kontakt auf und legt somit den Grundstein für eine Infektion. Nach der Anlagerung an den Rezeptor kommt es mithilfe des Fusionsproteins zur Verschmelzung von Wirtszelle und Virus und beide bilden eine Einheit (LAMB et al., 2006). Durch diese Fusionierung ist die Wirtszelle anfälliger für eine immunmedierte Zytolyse (GREENE & APPEL, 2006).

### 1.6.2. Epidemiologie

Die Virusausscheidung findet frühestens sieben Tage nach Infektion statt. Dabei erfolgt die Ausscheidung über alle Se- und Exkrete des Körpers. Da das CDV in der Umwelt nur eine kurze Überlebenszeit (< 24 Stunden) hat, muss eine direkte Übertragung von Tier zu Tier oder eine Tröpfcheninfektion stattfinden (GREENE & APPEL, 2006; MARTELLA et al., 2008).

Die am häufigsten an einer Staupe erkrankten Hunde sind in einem Alter zwischen drei und sechs Monaten. Noch jüngere Hunde sind meist durch maternale Antikörper geschützt. Die meisten älteren Hunde haben durch die Impfung einen ausreichenden Schutz (MARTELLA et al., 2008). Vandeveld und Mitarbeiter (1982) konnten bei neun experimentell infizierten Hunden nur bei zwei Hunden neurologische Symptome feststellen. Alle anderen waren klinisch unauffällig, so dass man bei vielen Hunden von einem subklinischen Verlauf der

Infektion ausgehen kann (VANDEVELDE et al., 1982). Eine Persistenz des Virus im infizierten Tier ist wahrscheinlich (STETTLER et al., 1997); man geht davon aus, dass viele klinisch genesene Hunde das Virus weiterhin im zentralen Nervensystem beherbergen. Dies lässt sich jedoch diagnostisch am lebenden Tier nur schwer nachweisen (GREENE & APPEL, 2006; MARTELLA et al., 2008).

Obwohl in den letzten Jahren eine interspezies-Übertragung des CDV gezeigt wurde und verschiedene terrestrische Karnivore als Wirtstiere nachgewiesen wurden, ist der Hund als Hauptwirt unumstritten (APPEL & SUMMERS, 1995). Durch Impfungen gegen das CDV, die vor allem in den Industrienationen durchgeführt werden, geht die Prävalenz zurück. So wurden in den letzten Jahren nur noch einzelne Krankheitsfälle der kaninen Staupe beschrieben (APPEL, 1987c; HORZINEK, 2006), jedoch können wildlebende Tiere weiterhin als Erregerreservoir für anfällige Hundepopulationen dienen (APPEL & SUMMERS, 1995). Eine endgültige Erregereliminierung ist somit kaum möglich. Die Ausbreitung der Infektion kann aber durch eine regelmäßige Impfung zurückgedrängt werden (APPEL, 1987c; HORZINEK, 2006). Allerdings weist das Hämagglutinationsprotein eine genetische Dynamik von etwa 10 % auf, so dass es trotz Impfung durch neue Genvariationen des CDV immer wieder zu Krankheitsausbrüchen durch neue Virusstämme kommen kann (MARTELLA et al., 2008). Die Beteiligung des CDV an caninen Atemwegsinfektionen scheint geographisch stark zu variieren, wie nachstehende Tabelle 6 zeigt.

**Tabelle 6: Ergebnisse von epidemiologischen Studien zum Nachweis des caninen Staupevirus in verschiedenen Hundepopulationen (PCR = Polymerase-Kettenreaktion).**

Land	Population	Anzahl/ Probenmaterial	PCR	Antikörper- nachweis	Literatur- angabe
<b>Ungarn</b>	Hunde mit respiratorischen, gastrointestinalen und neurologischen Symptomen	150 Urin-, Blut- und Nasentupferproben	30,7 % (46/150)	-	Demeter et al., 2007
<b>Japan</b>	Hunde mit respiratorischen Symptomen	68 Rachen- und Konjunktivalabstriche	1,5 % (1/68)	-	Mochizuki et al., 2008
<b>Japan</b>	gesunde Hunde	1031 Serumproben	-	72,0 % (744/1031)	Taguchi et al., 2011

### 1.6.3. Pathogenese

Der natürliche Infektionsweg erfolgt über Inhalation oder orale Aufnahme von Viruspartikeln (LAIDLAW & DUNKIN, 1926). Diese treten anschließend mit dem Epithel des oberen Respirationstrakts in Kontakt und vermehren sich innerhalb der nächsten 24 Stunden in Gewebemakrophagen. Mithilfe dieser Makrophagen breitet sich das Virus über die lokalen Lymphknoten bis zu den Tonsillen und den bronchialen Lymphknoten aus (APPEL, 1969). Am vierten bis sechsten Tag *post infectionem* kommt es zur Virusvermehrung in den Lymphfollikeln der Milz, der *Lamina propria* des Magens und des Dünndarms, in den Mesenteriallymphknoten und den Kupffer-Sternzellen der Leber. Die Folge der Virusvermehrung und -ausbreitung über das lymphatische Organsystem ist eine Erhöhung der Körpertemperatur und eine Lymphopenie, wobei diese durch die virale Zerstörung der B- und T-Lymphozyten durch CDV verursacht wird (GREENE & APPEL, 2006).

Acht bis neun Tage nach Infektion kommt es, in Abhängigkeit von der Immunlage des Hundes, zur weiteren Ausbreitung des CDV. Bleibt eine adäquate Immunantwort aus und kann der infizierte Körper den Erreger nicht eliminieren, breitet sich das CDV im epithelialen Gewebe und im ZNS aus. Die Epithelbesiedlung führt zu respiratorischen, gastrointestinalen oder dermatologischen Symptomen. Die Virusausscheidung beginnt ab dem Zeitpunkt der Epithelbesiedlung und erfolgt, auch bei subklinisch infizierten Hunden, über alle Körperexkrete und -sekrete. Besitzen die Hunde zwischen dem neunten und vierzehnten Tag *post infectionem* eine schlechte Immunabwehr, breitet sich das Virus über Haut, exokrine und endokrine Drüsen sowie über das Epithel des Gastrointestinal-, Respiration- und Urogenitaltrakts aus. Die betroffenen Hunde leiden dann unter schweren klinischen Symptomen, und das Virus persistiert bis zum Tod des Tieres im Gewebe. Oftmals wird die virale Infektion durch bakterielle Sekundärinfektionen verkompliziert (APPEL, 1969; APPEL, 1987c; GREENE & APPEL, 2006). Nach 14 Tagen haben die Hunde ausreichend Antikörper gegen das CDV aufgebaut und eine körpereigene Zytotoxizität eliminiert den Erreger aus den meisten Geweben. Extrazelluläre CDV werden durch Immunglobulin G-Antikörper neutralisiert. Dadurch wird die intrazelluläre Ausbreitung aufgehalten. Trotz der Erregereliminierung in den meisten Geweben kommt es häufig zur Persistenz des CDV in der Uvea, den Neuronen und

Epithelzellen der Haut, wie beispielsweise am Fußballen (APPEL, 1987c). Für die Persistenz des Erregers scheint eine Änderung innerhalb der Nukleokapsid- und Matrixgene, die eine zentrale Rolle im Aufbau des Virus spielen, verantwortlich zu sein (STETTLER et al., 1997). Zudem kann das Virus eine nicht-zytolytische Virusreplikation und -ausbreitung mit einer begrenzten Virusfreisetzung in den extrazellulären Raum durchführen. Dies führt zu einer verzögerten Immunantwort (ZURBRIGGEN et al., 1995). Die vollständige Erregereliminierung ist abhängig von Immunitätsdauer und Endpunkt der Virusausscheidung. Wenn es sich bei dem infizierenden CDV um ein hochvirulentes Virus handelt, der Hund einer großen Virusmenge ausgesetzt ist, er sich in einer Stresssituation befindet oder immunsupprimiert ist, kann das noch im Körper vorhandene Virus zu einem erneuten Krankheitsausbruch führen (GREENE & APPEL, 2006).

Bei einer Infektion des ZNS verursacht das Virus multiple Läsionen in der weißen und grauen Substanz des ZNS. Dabei besitzt das Virus vor allem eine größere Affinität zur weißen Substanz des Kleinhirns, zur periventrikulären weißen Substanz des vierten Ventrikels, zur Sehbahn und zum Rückenmark (HIGGINS et al., 1982). Das CDV penetriert die Blut-Hirn-Schranke durch die Infektion von mononukleären Zellen und tritt vor allem durch Zirkulation des Virus im Liquor und Fusionierung des Virus mit dem Ependym der Ventrikel in das Gehirn ein (HIGGINS et al., 1982). Das CDV verursacht eine Demyelinisierung. Pathogenetische Studien ergaben, dass bei einer CDV-induzierten Demyelinisierung zwischen einer akuten und einer chronischen Phase unterschieden werden kann, wobei die chronische Demyelinisierung vor allem durch eine lokal induzierte Immunreaktion ausgelöst wird (VANDEVELDE et al., 1982). Die Ätiologie der akuten Phase ist bislang noch nicht geklärt. Es wird jedoch vermutet, dass sie durch eine direkte Zerstörung durch das Virus (GLAUS et al., 1990) oder Degeneration des Myelins (STEIN et al., 2004) ausgelöst wird und ungefähr drei Wochen *post infectionem* durch eine massive virus-induzierte Immunsuppression entsteht (VANDEVELDE et al., 1982).

#### **1.6.4. Klinische Symptome**

Abhängig von verschiedenen Faktoren entwickeln sich keine oder nur milde klinische Symptome oder auch schwere Symptome, die zum Tod führen können (VANDEVELDE et al., 1982). Das klinische Erscheinungsbild variiert in

Abhängigkeit von der Virulenz des Virusstammes, den vorherrschenden Umweltbedingungen, dem Alter des Hundes und dessen Immunlage (MARTELLA et al., 2008). Es wird angenommen, dass bis zu 70,0 % der CDV-infizierten Hunde subklinisch infiziert sind (GREENE & APPEL, 2006). Milde Formen sind häufig und äußern sich in Apathie, Inappetenz, Fieber und Symptomen einer Infektion des oberen Respirationstrakts. Es können seröser bis mukopurulenter Nasen- und Augenausfluss sowie Husten und Dyspnoe auftreten (GREENE & APPEL, 2006; MARTELLA et al., 2008).

Schwerere akute Krankheitsformen treten vor allem bei ungeimpften Hunden im Alter von zwölf bis sechzehn Wochen auf, wenn sie ihre maternalen Antikörper verlieren oder bei jüngeren Welpen, die nicht ausreichend mit maternalen Antikörpern versorgt wurden. Die ersten klinischen Anzeichen sind meist eine seröse bis mukopurulente Konjunktivitis und ein nicht-produktiver Husten, der schnell in einen produktiven Husten übergeht. Bei der Lungenauskultation kann ein verschärftes Atemgeräusch wahrgenommen werden. Im weiteren Verlauf treten Apathie, Inappetenz, Erbrechen und Durchfall auf. Die betroffenen Hunde können plötzlich versterben, wenn keine adäquate Therapie durchgeführt wird (GREENE & APPEL, 2006).

Abhängig von Immunlage und Alter des infizierten Tieres, sowie der Virulenz des Virus können Infektionen des ZNS einen unterschiedlichen Verlauf nehmen (SHELL, 1990). Eine Staupeinfektion des ZNS bei jungen und immunsupprimierten Hunden verläuft meist als eine akute Infektion mit neurologischen Symptomen wie Kopfschiefhaltung, Nystagmus, partielle oder vollständige Paralyse, Krämpfe, Demenz, Kaubewegungen und unfreiwilligen ruckartigen Muskelkontraktionen. Die Symptome treten etwa drei Wochen nach Infektion und dem Abklingen der systemischen Staupe auf, wobei die meisten Tiere zwei bis vier Wochen nach dem Auftreten der Veränderungen versterben (TIPOLD et al., 1996). Einige der betroffenen Hunde überleben die akute neurologische Phase, allerdings bleiben meist neurologische Symptome, wie Kopfpresen und unkoordinierte Hypermetrie, als Zeichen der Viruspersistenz zurück (GREENE & APPEL, 2006). Bei Hunden, die eine kompetente Immunabwehr besitzen, äußern sich die neurologischen Symptome manchmal in Form einer chronischen Enzephalitis (SHELL, 1990). In seltenen Fällen kann sich bei infizierten adulten Hunden, die meist geimpft sind und keinen Vorbericht

einer akuten CDV-Infektion aufweisen, eine *šold dog encephalitis* entwickeln. Bislang wurden jedoch nur vereinzelt natürlich infizierte Fälle mit dieser Problematik beschrieben (CORDY, 1942; LINCOLN et al., 1971; LINCOLN et al., 1973; ADAMS et al., 1975; VANDEVELDE et al., 1980). Die genaue Ursache der *šold dog encephalitis* ist unbekannt. Möglicherweise entsteht sie aufgrund kumulativer Effekte einer chronischen subklinischen CDV-Enzephalitis (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 1995). Die Symptome äußern sich in progressiv schlechter werdenden, kortikal-neurologischen Symptomen, in Kombination mit Verwirrung des Patienten (AXTHELM & KRAKOWKA, 1998).

In seltenen Fällen treten vesikuläre und pustuläre Hautveränderungen auf. Das neurologische Krankheitsbild der kaninen Staupe kann mit einer Hyperkeratose an Nase und Ballen einhergehen (GREENE & APPEL, 2006). Tritt die kanine Staupe bei jungen Hunden, die sich noch im Wachstum befinden auf, sind nach Genesung bleibende Schäden wie das *šStaupegebiss* zu erkennen, das sich auf Grund einer Schmelzhypoplasie entwickelt (GREENE & APPEL, 2006).

#### **1.6.5. Diagnostik**

In der labordiagnostischen Untersuchung kann aufgrund der Lymphozytenzerstörung in vielen Fällen eine Lymphopenie nachgewiesen werden, die typischerweise bei sehr jungen Hunden mit einem schnellen progressiven Verlauf der Infektion oder neurologischen Symptomen auftritt. Des Weiteren kann es zu Thrombozytopenie, regenerativer Anämie, erhöhten Albumin-Konzentration und zur erniedrigten - und -Globulin-Konzentration kommen (GREENE & APPEL, 2006).

Eine hohe Sensitivität (100 %) und Spezifität (92 %) weisen die RT-PCR (FRISK et al., 1999; MORITZ et al., 2003) oder die real-time RT-PCR auf (ELIA et al., 2006). Frisk und Mitarbeiter (1999) überprüften die Sensitivität und Spezifität der RT-PCR bei 38 Serumproben und 17 Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Blut- und Liquorproben von Hunden mit Verdacht auf Staupe. Durch immunhistochemische Methoden und eine pathologische Untersuchung *post mortem* konnten bei 45 Hunden eine Staupe nachgewiesen werden. Die RT-PCR erbrachte in 86,2 % (25/29) der Serumproben und in 87,5 % (14/16) der EDTA-Blutproben und Liquorproben ein positives Ergebnis (FRISK et al., 1999).

Mithilfe der real-time RT-PCR kann zwischen Feld- und Impfstamm unterschieden werden. Durch eine Fluoreszenzmessung in der exponentiellen Phase der PCR kann eine Quantifizierung vorgenommen werden. Schon in der frühen Phase der Infektion reichen geringe Virusmengen für einen Virusnachweis aus (ELIA et al., 2006).

In einer Studie wurde bei sieben experimentell infizierten Hunden unterschiedliches Probenmaterial zum Nachweis einer CDV-Infektion untersucht. Über 14 Tage wurden täglich EDTA-Blutproben, Konjunktival- und Nasentupfer, Urin- und Liquorproben entnommen und mittels RT-PCR auf CDV untersucht. In den Konjunktivaltupfern konnten CDV von Tag 1 bis Tag 14 nachgewiesen werden, wobei ab Tag 3 alle sieben Hunde positiv getestet wurden. In den EDTA-Blutproben waren alle sieben Hunde von Tag 6 bis Tag 9 positiv, und in den Nasentupfern konnten CDV von Tag 3 bis Tag 14 nachgewiesen werden, jedoch konnte zu keinem Zeitpunkt alle sieben Hunde positiv getestet werden. Die Urinproben ergaben einen positiven CDV-Nachweis von Tag 5 bis Tag 14; lediglich an Tag 6 waren in der Urinprobe alle sieben Hunde positiv. Über den gesamten Zeitraum des Experiments war das CDV bei keinem Hund im Liquor nachweisbar. Somit war der Nachweis des CDV im Konjunktivaltupfer im Vergleich zu den anderen Proben am sensitivsten und empfiehlt sich für den Nachweis einer CDV-Infektion (KIM et al., 2006).

Zum Nachweis von intrazellulärem viralem Antigen kann der IFT aus Konjunktival-, Nasal- und Vaginalabstrich durchgeführt werden. Er weist jedoch eine geringe Sensitivität auf und kann das CDV-Antigen nur innerhalb der ersten drei Wochen während der akuten Phase der Infektion nachweisen, wenn sich das Virus noch in Epithelzellen befindet (APPEL, 1987c).

Methoden zum Antikörpernachweis wie der IFT oder der ELISA besitzen aufgrund von impfinduzierten Antikörpern oder vorangegangenen Infektionen zur Diagnosefindung eine untergeordnete Bedeutung und sollte nur als Analyse eines Serumpaars eingesetzt werden (FRISK et al., 1999). Bei Hunden, die an neurologischen Symptomen leiden, kann eine Untersuchung des Liquors hilfreich sein. Typischerweise kommt es bei einer Staupeinfektion zu einem erhöhten Proteingehalt ( $> 25$  Milligramm pro Deziliter (mg/dl)) und einer erhöhten Zellzahl ( $> 10$ /Mikroliter ( $\mu$ l)) (GREENE & APPEL, 2006).

### 1.7. Weitere virale Erreger

Neben den bereits beschriebenen viralen Pathogenen werden weitere Viren als Auslöser von respiratorischen Symptomen beim Hund beschrieben, deren Bedeutung jedoch noch nicht eindeutig geklärt ist. Das canine Reovirus konnte bei Hunden, die an Infektionen des oberen Respirationstrakts (BINN et al., 1977), Pneumonien (LOU & WENNER, 1963) oder Enteritis (APPEL, 1987a) litten, in Koinfektionen mit dem CDV und dem caninen Parvovirus 2 isoliert werden. Das Virus alleine scheint jedoch keine primäre Pathogenität aufzuweisen. Das Virus kann Krankheiten des Respirationstrakts wahrscheinlich nur in Synergie mit anderen respiratorischen Erregern auslösen (APPEL, 1987a).

Ein weiteres kürzlich erst isoliertes Virus, das canine Pneumonievirus (CnPnV), das zur Familie der *Paramyxoviridae* der Subfamilie *Pneumovirinae* gehört, scheint das Potenzial zu besitzen, akute respiratorische Infektionen beim Hund auszulösen. Es konnte im Zusammenhang mit respiratorischen Symptomen bei Hunden aus Nasen- und Rachentupfern nachgewiesen werden. Es wurde jedoch in vielen Fällen gemeinsam mit multiplen anderen Erregern detektiert (RENSHAW et al., 2010). Um genauere Aussagen über die Prävalenz des Virus in der Hundepopulation und die Bedeutung im CIRD-Krankheitskomplex machen zu können, werden weitere Untersuchungen benötigt (RENSHAW et al., 2011).

Kürzlich konnte ein Hepatitis-C-ähnliches Virus, das canine Hepacivirus, aus der Lunge von Hunden mit respiratorischen Symptomen isoliert werden. Ob ein Zusammenhang zwischen dem Virus und akuten respiratorischen Infektionen beim Hund besteht, bedarf weiterer Untersuchungen (KAPOOR et al., 2011).

## 2. Bakterielle Erreger

Neben viralen Erregern sind an akuten respiratorischen Infektionen des Hundes auch Bakterien beteiligt. Viele Bakterien fungieren hierbei vor allem als Sekundärerreger und führen zur Verschlechterung der klinischen Symptome einer viralen Primärinfektion (APPEL & BINN, 1987a). Einige Bakterien können jedoch auch als Primärerreger bei der Entstehung von respiratorischen Krankheiten eine wichtige Rolle spielen. In diesem Zusammenhang wird *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*) (WRIGHT et al., 1973), *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* (CHALKER et al., 2003b) und *Mycoplasma cynos* (CHVALA et al., 2007; MANNERING et al., 2009) eine



Rolle als primäre respiratorische Pathogene zugesprochen.

### 2.1. *Bordetella bronchiseptica*

Neben dem CPiV wird das Bakterium *B. bronchiseptica* als ein Haupterreger bei der Entstehung des CIRDC-Komplexes angesehen (BEMIS et al., 1977a). *B. bronchiseptica* wird als Primärerreger von akuten respiratorischen Infektionen des Hundes angesehen, da der Erreger in der Lage ist, sowohl bei natürlichen, als auch bei experimentell induzierten Infektionen respiratorische Symptome auszulösen, ohne dass eine andere virale oder bakterielle Infektion vorliegt (THOMPSON et al., 1976; BEMIS et al., 1977a; KEIL & FENWICK, 2000).

#### 2.1.1. Ätiologie

*B. bronchiseptica* ist ein kokkoidförmiges, bewegliches, aerobes, gramnegatives Stäbchenbakterium und ist Katalase- und Oxidase-positiv. Seine Beweglichkeit hat das Bakterium seiner peritrichen (von griechisch: peri = um, herum; trichos = Haar) Begeißelung zu verdanken. Es unterscheidet sich somit wesentlich von den beiden amotilen Bakterien *Bordetella pertussis* (*B. pertussis*) und *Bordetella parapertussis* (*B. parapertussis*) (QUINN et al., 2002).

Das Bakterium weist eine hohe Affinität zum Flimmerepithel des Respirationstrakts auf. Es konnte bei Hunden mit Rhinitis, Sinusitis, Tracheitis, Bronchitis und Pneumonie isoliert werden (BATEY & SMITS, 1976; BEMIS et al., 1977a; BEMIS & KENNEDY, 1981).

#### 2.1.2. Epidemiologie

*B. bronchiseptica* wurde 1910 das erste Mal aus der Trachea und den Bronchien von Hunden mit Staupe isoliert (FERRY, 1910). Im Laufe der Zeit wurde es dem Genus *Bordetella* gemeinsam mit *B. pertussis* und *B. parapertussis* zugeschrieben (PITTMAN, 1974). *B. bronchiseptica* und *B. pertussis* weisen eine enge Verwandtschaft auf, jedoch infiziert *B. pertussis* ausschließlich den Menschen und löst dort den Keuchhusten aus (KEIL & FENWICK, 2000). Auch *B. bronchiseptica* konnte bei immunsupprimierten Menschen isoliert werden (GUEIRARD et al., 1995; MAZUMDER & CLEVELAND, 2010).

Infektionen mit *B. bronchiseptica* wurden bei Hunden (FERRY, 1910), Katzen (FISK & SOAVE, 1973), Schweinen (GANAWAY et al., 1965), Kaninchen

(FERRY & KLIX, 1920), Versuchsnagetieren (FERRY, 1913) und beim Menschen (WOOLFREY & MOODY, 1991) beschrieben. Typischerweise besiedelt das Bakterium beim Hund den Respirationstrakt. Es kann in der Regel nicht aus anderen Geweben isoliert werden (FORD, 2006). Das optimale Wachstum des Erregers liegt bei 35,0 °C bis 37,0 °C. *B. bronchiseptica* ist in der Lage, Erythrozyten zu agglutinieren. Diese Eigenschaft macht man sich beim Nachweis von Bordetellen in der Kultur zunutze, da die Bakterien - hämolysierende Kolonien beim Wachstum auf Blutagar bilden (BEMIS et al., 1977b).

Eine Infektion mit *B. bronchiseptica* tritt vor allem bei Welpen kurz nach dem Absetzen von der Mutter auf. Die Infektion beeinträchtigt oft das Wachstum der Hunde (BEMIS et al., 1977c). Nach Infektion kann die vollständige Beseitigung von *B. bronchiseptica* aus der Nasenhöhle von experimentell infizierten Hunden bis zu 14 Wochen dauern. Diese Hunde fungieren somit über einen langen Zeitraum als Überträger (BEMIS et al., 1977a).

Chalker und Mitarbeiter (2003a) untersuchten BALF-Proben von 156 in einem Zwinger gehaltenen Hunden nach deren Euthanasie. Bei 34,6 % (54/156) der asymptomatischen Hunde und 16,7 % (26/156) mit milden, 30,1 % (47/156) mit moderaten und 16,0 % (25/156) mit schweren respiratorischen Symptomen konnte *B. bronchiseptica* kulturell nachgewiesen werden. Somit konnte das Bakterium auch bei klinisch gesunden Hunden aus den unteren Atemwegen nachgewiesen werden (CHALKER et al., 2003a). In Japan, Deutschland und den USA wurden Studien zum direkten *B.-bronchiseptica*-Nachweis aus Tupferproben, Lungen- oder Trachealspülproben durchgeführt (Tabelle 7).

**Tabelle 7: Ergebnisse von epidemiologischen Studien zum *Bordetella-bronchiseptica*-Nachweis in verschiedenen Hundepopulationen (PCR = Polymerase-Kettenreaktion, BALF = Bronchoalveolarlavage-Flüssigkeit).**

Land	Population	Anzahl/ Probenmaterial	Erregernachweis		Literatur- angabe
			Kultur	PCR	
<b>Japan</b>	Hunde mit akuten respiratorischen Symptomen	68 Rachen-, Nasen- und Konjunktivaltupfer	-	10,3 % (7/68)	Mochizuki et al., 2008
<b>Deutschland</b>	Hunde mit respiratorischen Symptomen	99 BALF-Proben	20,2 % (20/99)	-	Steinfeld et al., 2012
<b>USA</b>	Hunde mit Infektion des unteren Respirationstrakts	264 Trachealspülproben	12,1 % (32/264)	-	Angus et al., 1997

In einer weiteren Studie wurde kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *B. bronchiseptica*-Antikörpern und respiratorischen Symptomen in einer Hundepopulation hergestellt (ELLIS et al., 2011).

### 2.1.3. Pathogenese

Die Übertragung von *B. bronchiseptica* erfolgt über den direkten oder indirekten Kontakt zu infizierten Tieren mittels Tröpfcheninfektion. Selten auch durch Kontakt zu stark kontaminierten Gegenständen (FORD, 2006; KEIL & FENWICK, 1998).

In Erwiderung auf Umweltgegebenheiten, wie eine Veränderungen der Temperatur, induziert das Transduktionssystem des Virulenzgens der Bordetellen einen Wechsel zwischen virulenter, intermediärer und avirulenter Phase (COOTE, 2001; PASSERINI DE ROSSI et al., 2001). Virulente Bakterien sind in der Lage, ein Typ-III-Sekretionssystem in Anspruch zu nehmen, welches Bakterienproteine mittels Integrins in das Zytosol der Wirtszelle übertragen kann (KEIL & FENWICK, 1998; KEIL & FENWICK, 2000; WINSTANLEY et al., 2000). Dies scheint den Organismus vor der Komplement-medierten Zerstörung und der oxidativen Schädigung durch Phagozytose zu schützen und entzieht den Erreger der Immunabwehr des Wirtstieres. Dieser Mechanismus trägt dazu bei, dass das Bakterium im Wirtstier persistieren kann (KEIL & FENWICK, 1998).

Bei *B. bronchiseptica* unterscheidet man zwischen den Fimbrien-Adhäsions-Proteinen und den nicht-Fimbrien-Adhäsions-Proteinen. Beide Arten von Proteinen binden an spezifische Rezeptoren im Respirationstrakt und besitzen eine große Bedeutung bei der Entstehung einer Infektion (KEIL & FENWICK, 2000; HALPERIN, 2001). Fimbrien, auch Pili genannt, sind haarähnliche Zellfortsätze, die eine Verbindung zwischen der Bakterienmembran und der Wirtszelle herstellen. Sie helfen dabei, sowohl die Zielzelle des zilientragenden Epithels des Respirationstrakts, als auch die Art der Wirtsspezies zu erkennen (KEIL & FENWICK, 2000). Die nicht-Fimbrien-Adhäsions-Proteine erleichtern die Kolonisierung durch das Bakterium. Hierbei unterstützt das filamentöse Hämagglutinin die Zilienbindung (COTTER et al., 1998; KEIL & FENWICK, 2000; HALPERIN, 2001) und das Pertactin die Bindung zur Wirtszelle (KEIL & FENWICK, 2000; HALPERIN, 2001).

Die Zellwand von *B. bronchiseptica* beinhaltet Lipopolysaccharide (LPS) oder Endotoxine, die die Sekretion von Zytokinen stimulieren (HALPERIN, 2001; QUINN et al., 2002). Bisher ist die Rolle des LPS bei der Entstehung einer Infektion noch nicht eindeutig definiert, aber es führt möglicherweise zur Kolonisierung des Respirationstrakts und bewirkt einen Schutz gegen antimikrobielle Substanzen (HARVILL et al., 2000). Wichtige Exotoxine, die vom Bakterium produziert werden, sind das tracheale Zytotoxin, das dermonekrotisierende Toxin und das Adenylatzyklase-Toxin, die für die Zerstörung der Zilienzellen und Inhibition der Zilienfunktion, die Unterdrückung der humoralen und zellmedierten Abwehrreaktion und die Hemmung der Phagozytose von Neutrophilen und Makrophagen verantwortlich sind (KEIL & FENWICK, 2000; HALPERIN, 2001).

#### **2.1.4. Klinische Symptome**

Als charakteristisches Symptom einer Infektion mit *B. bronchiseptica* wurde bei experimentell infizierten Hunden ein trockener, keuchender, krampfartiger Husten beobachtet, dessen Intensität in Bewegung und bei Aufregung zunimmt (MCCANDLISH et al., 1976; SHELTON et al., 1977). Weitere Symptome bei infizierten Hunden sind Nasenausfluss, Würgen, Anorexie, Apathie und Fieber (BATEY & SMITS, 1976; THOMPSON et al., 1976; BEMIS et al., 1977a; THRUSFIELD et al., 1991).

Die Dauer der klinischen Symptome scheint relativ variabel zu sein und kann von ein bis zwei Tagen bis hin zu mehreren Wochen anhalten. Somit hat der Erreger das Potenzial, aus einem akuten Geschehen in eine chronische Infektion überzugehen (MCCANDLISH et al., 1976; GOODNOW & SHADE, 1980). Auch nach Abklingen der klinischen Symptome können die Bordetellen noch etwa zwei bis drei Monate ausgeschieden werden. Dies lässt die klinischen genesenen Hunde als mögliche Überträger fungieren (BEMIS et al., 1977a). Deshalb ist es wichtig, die Bakterienausscheidung von infizierten Hunden durch geeignete Therapiemaßnahmen zu dezimieren und dadurch das Risiko einer Krankheitsübertragung zu reduzieren (IEMURA et al., 2009).

Bei Hunden, die immunsupprimiert oder mit weiteren viralen oder bakteriellen Erregern infiziert sind, kann eine Bronchopneumonie entstehen, und der Hund kann versterben. Weitere Risikofaktoren für die Ausbildung einer komplizierten

oder persistierenden Infektion sind chronische Lungenkrankheiten wie chronische Bronchitis, ziliäre Dyskinesie oder eine hypoplastische oder kollabierte Trachea (APPEL, 1981; KEIL & FENWICK, 1998).

### 2.1.5. Diagnostik

Im Blutbild können eine Neutrophilie mit Linksverschiebung und eine Monozytose vorhanden sein (CHLADEK et al., 1981; ELLIS et al., 2001). Eine definitive Diagnose lässt sich nur anhand des Erregernachweises aus Nasentupfern, Rachentupfern oder einer Trachealspülprobe stellen (QUINN et al., 2002). Die Trachealspülprobe stellt hierbei im Vergleich zum Rachentupfer die bessere Methode zum Nachweis von pathogenen Bakterien dar (THOMPSON et al., 1976; SUMNER et al., 2011). Die Bakterienisolierung war bis zur Entwicklung einer PCR die Standardmethode in der Bordetellen-Diagnostik. Der kulturelle Nachweis besitzt eine hohe Spezifität, aber eine niedrige Sensitivität von nur etwa 50 %, (HALLANDER et al., 1991). Bis eine Diagnose gestellt werden kann, benötigt die Kultur eine Anzucht von drei bis sieben Tagen (FRIEDMAN, 1988).

Die PCR ist eine schnellere und sensitive Methode zum Nachweis einer Bordetellen-Infektion. In einer Studie wurden 66 nasopharyngeale Tupferproben von Hunden mittels Kultur und PCR auf *Bordetella* Spezies (spp.) untersucht. Bereits 19,7 % (13/66) der Proben konnten in der Bakterienisolierung als positiv bewertet werden. Durch die PCR erhöhte sich die Anzahl der positiven Proben auf 28,8 % (19/66) (REIZENSTEIN et al., 1993). Eine PCR, die auf dem Nachweis des Adenylatzyklase-Toxins basiert, kann zwar *Bordetella* spp. nachweisen, jedoch keine Speziesdifferenzierung erbringen (DOUGLAS et al., 1993). Mithilfe einer Folgeanalyse, bei der durch Restriktionsenzyme eine Spaltung der amplifizierten DNA-Sequenzen hervorgerufen wird, ist eine Unterscheidung zwischen *B. pertussis*, *B. paraptussis* und *B. bronchiseptica* möglich (REIZENSTEIN et al., 1993). Hozbor und Mitarbeiter (1999) entwickelten eine PCR, die auf eine Region in der DNA abzielt, die für die Codierung des Flagellin-Strukturgens verantwortlich ist (*fla*-Gen). Dieses Gen wird nur von motilen *B. bronchiseptica* exprimiert und ist somit ein geeignetes Zielgen für den Nachweis dieses Erregers (HOZBOR et al., 1999).

Ein Antikörpernachweis aus Serumproben erbrachte keine Korrelation mit dem klinischen Bild einer Bordetellen-Infektion und dem Nachweis des Erregers aus Lungenspülproben bei natürlich infizierten Hunden. Die Diagnose einer Infektion kann somit durch den Nachweis von Antikörpern nicht erbracht werden (CHALKER et al., 2003a).

## 2.2. Weitere bakterielle Erreger

Neben *B. bronchiseptica* können weitere Bakterien als Auslöser von caninen Atemwegsinfektionen eine Rolle spielen, wobei die meisten Bakterien vor allem als Sekundärerreger fungieren (APPEL, 1981). Mykoplasmen werden als Teil der normalen Keimflora des oberen Atmungstrakts beim Hund angesehen (ROSENDAL, 1982), können aber als Erreger bei Pneumonien beteiligt sein (HONG & KIM, 2012). *Mycoplasma canis*, *Mycoplasma cynos*, *Mycoplasma edwardii*, *Mycoplasma maculosum* und *Mycoplasma spumans* konnten aus der Nasenhöhle von sowohl gesunden als auch kranken Hunden isoliert werden (CHALKER, 2005). Nur *Mycoplasma cynos* wird beim Hund bisher als einziger Erreger angesehen, der mit respiratorischen Symptomen assoziiert ist (ROSENDAL, 1978, 1982; CHALKER et al., 2004; ZEUGSWETTER et al., 2007).

Das Bakterium *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* wird seit einigen Jahren als Erreger respiratorischen Erkrankungen beim Hund diskutiert (GARNETT et al., 1982). Der Erreger wurde bei verschiedenen Ausbrüchen von akuten Atemwegsinfektionen bei Hunden mit teils letalem Ausgang nachgewiesen und gilt als primäres respiratorisches Pathogen (CHALKER et al., 2003b; KIM et al., 2007; PESAVENTO et al., 2008; BYUN et al., 2009). Histologisch konnten bei infizierten Hunden akute, fibrinös-eitrige, nekrotisierende und hämorrhagische Pneumonien nachgewiesen werden (PRIESTNALL et al., 2010).

### **III. MATERIAL UND METHODEN**

#### **1. Material**

Insgesamt nahmen 151 Hunde an der Studie teil. Diese wurden in zwei Gruppen eingeteilt: eine Gruppe mit akuten respiratorischen Symptomen und eine klinisch gesunde Kontrollgruppe.

##### **1.1. Patientengut**

Für den Nachweis viraler Erreger und *B. bronchiseptica* wurden im Zeitraum von Juli 2011 bis Juli 2012 Nasen- und Rachentupfer von 151 Hunden entnommen. Die Hunde wurden entweder in der Medizinischen Kleintierklinik München der Ludwig-Maximilians-Universität (n = 90) oder in der Klein- und Großtierpraxis Dr. Gerhard Glöckner in Stockstadt/Main (n = 3) vorgestellt. Außerdem wurden Hunde, die im Tierheim Beckstetten/Jengen (n = 29) und dem Veterinärwissenschaftlichen Department (n = 29), Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik der Ludwig-Maximilians-Universität München, gehalten wurden, in die Studie aufgenommen.

##### **1.2. Ein- und Ausschlusskriterien**

Insgesamt wurden 61 Hunde mit respiratorischen Symptomen in die Studie aufgenommen. Einschlusskriterium für die Studienaufnahme der Patienten war das Vorliegen von akuten respiratorischen Symptomen, wie Husten, Niesen, Nasenausfluss und Dyspnoe, innerhalb der letzten zwei Wochen vor Vorstellung. Ausschlusskriterien für die Gruppe der kranken Hunde waren kardial, neoplastisch, anatomisch sowie funktionell bedingte Atemwegsprobleme (beispielsweise Brachyzephalensyndrom, Trachealkollaps oder Larynxparalyse) sowie Atemwegsprobleme, die durch Thoraxergüsse bedingt waren. Eine Studienaufnahme erfolgte basierend auf den Ergebnissen der klinischen Untersuchung und, falls nötig, radiologischen und/oder echokardiographischen Untersuchungen.

Einschlusskriterium für die Gruppe der klinisch gesunden Hunde (n = 90) war eine unauffällige klinische Untersuchung. Ausschlusskriterien für diese Gruppe waren klinische Auffälligkeiten, das vorberichtliche Auftreten von respiratorischen Symptomen innerhalb der letzten acht Monate sowie eine

Impfung innerhalb der letzten vier Wochen.

### 1.3. Signalement

Das Alter, das Geschlecht und die Rasse jedes Studienteilnehmers wurden erfasst. Die Erhebung des Signalements erfolgte durch einen standardisierten Fragebogen.

#### 1.3.1. Alter

In Tabelle 8 wird das Alter getrennt nach respiratorisch kranken und klinisch gesunden Hunden dargestellt. Angegeben werden das minimale und maximale Alter, der Mittelwert und Median des Alters sowie die Standardabweichung (SD) von respiratorisch kranken und klinisch gesunden Hunden. Bei einem klinisch gesunden Hund und drei Hunden mit respiratorischen Symptomen lagen keine Altersangaben vor.

**Tabelle 8: Angabe des Alters in Jahren getrennt nach respiratorisch kranken und klinisch gesunden Hunden (Min. = Minimum, Max. = Maximum, SD = Standardabweichung).**

Gruppen	Min.	Max.	Mittelwert	Median	SD
<b>kranke Hunde (n = 58)</b>	0,25	16,00	4,851	3,50	4,414
<b>gesunde Hunde (n = 89)</b>	0,25	13,00	3,885	3,25	2,825

Der Vergleich der Mittelwerte beider Gruppen ergab mit  $p = 0,156$  bei einem Konfidenzintervall (KI) von 95 % keinen statistisch signifikanten Altersunterschied. Insgesamt 60,3 % (35/58) der Hunde mit Atemwegserkrankungen waren zum Zeitpunkt des Auftretens respiratorischer Symptome jünger als fünf Jahre.

#### 1.3.2. Geschlecht

Tabelle 9 veranschaulicht die Geschlechtsverteilung der respiratorisch kranken und klinisch gesunden Hunde. Außerdem werden beide Gruppen miteinander verglichen.



**Tabelle 9: Geschlechtsverteilung respiratorisch kranker und klinisch gesunder Hunde sowie der Vergleich beider Gruppen. Die grau unterlegten Felder verdeutlichen einen signifikanten Unterschied.**

<b>Geschlecht</b>	<b>krankte Hunde (n = 61)</b>	<b>gesunde Hunde (n = 90)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>männlich intakt</b>	26 (42,6 %)	16 (17,8 %)	0,001
<b>männlich kastriert</b>	13 (21,3 %)	20 (22,2 %)	1,000
<b>weiblich intakt</b>	9 (14,8 %)	33 (36,7 %)	0,003
<b>weiblich kastriert</b>	13 (21,3 %)	21 (23,3 %)	0,844

### 1.3.3. Rasse

Insgesamt waren 39,3 % (24/61) der Hunde mit respiratorischen Symptomen und 32,2 % (29/90) der klinisch gesunden Hunde Mischlings-Hunde. In Tabelle 10 werden alle Hunderassen, die im Rahmen der Studie aufgetreten sind, aufgeführt. Die Einteilung erfolgte hierbei nach der Klassifizierung der Weltorganisation der Kynologie (F. C. I.) in zehn Gruppen.

**Tabelle 10: Übersicht über alle in die Studie eingeschlossenen Rassehunde. Die Einteilung erfolgte nach der Nomenklatur der Rassen der Weltorganisation der Kynologie (HTTP://WWW.FCLBE/, 2010)**

Gruppen von Hunderassen	Hunderassen	krankte Hunde (n = 37)	gesunde Hunde (n = 61)
Gruppe 1 Hütehunde und Treibhunde	Belgischer Schäferhund	0	1 (1,6 %)
	Australian Cattle Dog	0	1 (1,6 %)
	Australian Shepherd	1 (2,7 %)	3 (4,9 %)
	Border Collie	1 (2,7 %)	0
	Sonstige	0	1 (1,6 %)
Gruppe 2 Schnauzer/Pinscher/Molosser	Hovawart	0	1 (1,6 %)
	Dobermann	1 (2,7 %)	2 (3,3 %)
	Rottweiler	2 (5,4 %)	1 (1,6 %)
	Perro dogo Mallorquin	0	1 (1,6 %)
	Landseer	1 (2,7 %)	0
	Leonberger	1 (2,7 %)	0
	Berner Sennenhund	1 (2,7 %)	0
Gruppe 3 Terrier	Parson-Russell-Terrier	0	1 (1,6 %)
	Jack-Russell-Terrier	5 (13,5 %)	1 (1,6 %)
	Yorkshire Terrier	1 (2,7 %)	0
Gruppe 4 Dachshunde	-	0	0
Gruppe 5 Spitze/Hunde vom Urtyp	Podenco Canario	0	1 (1,6 %)
	Portugisischer Podenco	1 (2,7 %)	1 (1,6 %)
	Sibirien Husky	0	1 (1,6 %)
	American Akita Inu	1 (2,7 %)	0
	Akita Inu	1 (2,7 %)	0
	Zwergspitz	4 (10,8 %)	0
Gruppe 6 Laufhunde/Schweißhunde	Bayerischer Gebirgsschweißhund	0	1 (1,6 %)
	Beagle	1 (2,7 %)	29 (47,5 %)
	Rhodesian Ridgback	1 (2,7 %)	0
Gruppe 7 Vorstehhunde	Pudelpointer	1 (2,7 %)	0
	Epagneul Breton	1 (2,7 %)	0
	Magyar Vizsla	2 (5,4 %)	0
	Weimaraner	1 (2,7 %)	0
	Irish Red Setter	1 (2,7 %)	0
Gruppe 8 Apportier-/Wasserhunde	Labrador Retriever	2 (5,4 %)	12 (19,7 %)
	Golden Retriever	2 (5,4 %)	0
	English Cocker Spaniel	1 (2,7 %)	0
Gruppe 9 Gesellschafts-/Begleithunde	Großpudel	0	1 (1,6 %)
	Mops	0	1 (1,6 %)
	Pekingese	0	1 (1,6 %)
	Tibet-Terrier	1 (2,7 %)	0
	Französische Bulldogge	1 (2,7 %)	0
Gruppe 10 Windhunde	Whippet	1 (2,7 %)	0

#### 1.4. Anamnese

Von jedem Patienten, der in die Studie einging, wurde eine Anamnese mithilfe eines standardisierten Anamnesebogens (siehe Anhang) erhoben. Die darin enthaltenen Punkte werden in Tabelle 11 aufgeführt.

**Tabelle 11: Übersicht über die anamnestisch erhobenen Informationen bei Hunden mit respiratorischen Symptomen und klinisch gesunden Hunden.**

<b>klinisch gesunde und respiratorisch kranke Hunde</b>	<b>nur respiratorisch kranke Hunde</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Herkunft des Hundes</li> <li>• Auslandsaufenthalt</li> <li>• Lebensraum (Stadt, Land)</li> <li>• Kontakttiere</li> <li>• Aufenthalt in Hundeschulen, Tierheimen, Tierpensionen</li> <li>• Auftreten von Atemwegssymptomen in der Vergangenheit</li> <li>• akute Atemwegsprobleme von Hunden in der Umgebung</li> <li>• Impfhistorie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Art der Symptome (Husten, Niesen, Nasenausfluss, Dyspnoe, andere)</li> <li>• Dauer der Symptome (Angabe in Tagen)</li> <li>• Verschlechterung der Symptomatik               <ul style="list-style-type: none"> <li>a) bei Anstrengung</li> <li>b) im Krankheitsverlauf</li> </ul> </li> <li>• begleitende Symptome (gastrointestinale, ophthalmologische, neurologische, dermatologische, andere)</li> </ul>

##### 1.4.1. Herkunft des Tieres und Lebensraum

Bei der Herkunft des Hundes wurde zwischen Zucht, Tierheim, Tierpension, Tierschutzorganisation, eigener Wurf sowie Fundtier unterschieden. Außerdem wurde zwischen einer Haltung des Tieres in der Stadt, auf dem Land oder in einem Randgebiet zur Stadt differenziert. In Tabelle 12 werden die anamnestisch erfragten Punkte aufgeführt sowie der Vergleich zwischen der respiratorisch kranken und der klinisch gesunden Kontrollgruppe aufgeführt.

**Tabelle 12: Herkunft und Lebensraum der respiratorisch kranken und klinisch gesunden Hunde, sowie der Vergleich beider Gruppen. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden grau unterlegt.**

anamnestische Faktoren		krankte Hunde (n = 61)	gesunde Hunde (n = 90)	p-Wert
<b>Herkunft</b>	<b>Zucht</b>	20 (32,8 %)	25 (27,8 %)	0,587
	<b>Tierheim</b>	21 (34,4 %)	21 (23,3 %)	0,144
	<b>Tierpension</b>	1 (1,6 %)	0	0,404
	<b>Tierschutzorganisation</b>	8 (13,1 %)	7 (7,8 %)	0,406
	<b>eigener Wurf</b>	7 (11,5 %)	35 (38,9 %)	< 0,001
	<b>Fundtier</b>	4 (6,6 %)	2 (2,2 %)	0,222
<b>Lebensraum</b>	<b>Stadt</b>	30 (49,2 %)	59 (65,6 %)	0,063
	<b>Land</b>	26 (42,6 %)	25 (27,8 %)	0,079
	<b>Randgebiet</b>	2 (3,3 %)	0	0,162
	<b>Stadt und Land</b>	3 (4,9 %)	6 (6,7 %)	0,740

#### 1.4.2. Auslandsaufenthalt

Insgesamt waren 60,8 % (31/51) der Hunde mit respiratorischen Symptomen und 45,6 % (36/79) der klinisch gesunden Hunde vorberichtlich im Ausland oder stammten aus dem Ausland. Im Vergleich wurde kein Unterschied zwischen beiden Gruppen für diesen Parameter festgestellt ( $p = 0,107$ ). Von 13,9 % (21/151) der Hunde fehlten die Angaben zu einem vorberichtlichen Auslandsaufenthalt.

#### 1.4.3. Kontakttiere

Es wurde der Kontakt zu Katzen, Pferden, Schweinen, Kühen, Vögeln, und Wildtieren erfragt. Eine Mehrfachantwort war möglich. Insgesamt lagen von 67,2 % (41/61) der respiratorisch kranken und 40,0 % (36/90) der klinisch gesunden Hunden Informationen zu Kontakttieren vor. In Tabelle 13 sind die Ergebnisse der angegebenen Kontakttiere von Hunden mit respiratorischen Symptomen und von klinisch gesunden Hunden angegeben.

**Tabelle 13: Kontakttiere der respiratorisch kranken und der klinisch gesunden Hunde sowie der Vergleich zwischen beiden Gruppen.**

Kontakttiere	krankte Hunde (n = 41)	gesunde Hunde (n = 36)	p-Wert
<b>Katzen</b>	12 (29,3 %)	18 (50,0 %)	0,100
<b>Pferde</b>	10 (24,2 %)	14 (38,9 %)	0,220
<b>Schweine</b>	1 (2,4 %)	0	1,000
<b>Kühe</b>	2 (4,9 %)	7 (19,4 %)	0,074
<b>Vögel</b>	11 (26,8 %)	6 (16,7 %)	0,410
<b>Wildtiere</b>	1 (2,4 %)	1 (2,8 %)	1,000

Außerdem wurde der Kontakt zu anderen Hunden untersucht. Es hatten alle klinisch gesunden Hunde (n = 90) und 95,1 % (58/61) der Hunde mit respiratorischen Symptomen vorberichtlich Kontakt zu anderen Hunden aus der Umgebung. Es konnte zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Kontakts zu anderen Hunden festgestellt werden (p = 0,064).

#### 1.4.4. Kontakt zu Hundepopulationen

Ein vorberichtlicher Aufenthalt der respiratorisch kranken und klinisch gesunden Hunden in Einrichtungen mit dichter Hundepopulation wie Tierheimen, Auffangstationen, Hundepensionen, Hundeschulen, Tierkliniken sowie Lehr- und Versuchsanstalten ist in Tabelle 14 dargestellt.

**Tabelle 14: Aufenthalt in Einrichtungen mit dichter Hundepopulation der respiratorisch kranken und klinisch gesunden Hunde sowie der Vergleich beider Gruppen. Signifikante Unterschiede wurden grau unterlegt.**

Einrichtungen dichter Hundepopulationen	krankte Hunde (n = 61)	gesunde Hunde (n = 90)	p-Wert
<b>Hundepension</b>	1 (1,6 %)	7 (7,8 %)	0,261
<b>Hundeschule</b>	13 (21,3 %)	15 (16,7 %)	0,525
<b>Tierheim/Auffangstation</b>	21 (34,4 %)	18 (20,0 %)	0,059
<b>Tierklinik</b>	0	8 (8,9 %)	0,022
<b>Lehr- und Versuchsgut</b>	0	29 (32,2 %)	< 0,001

#### 1.4.5. Impfung

In Tabelle 15 werden die vorberichtlich erfolgten Impfungen bei respiratorisch kranken und klinisch gesunden Hunden dargestellt. Eine regelmäßige Impfung bestand, wenn der Hund grundimmunisiert worden und nach Impfpflichtung der Ständigen Impfkommision Veterinär (StIKo Vet.) des Bundesverbands praktizierender Tierärzte (bpt) eine regelmäßige Auffrischung der einzelnen Impfstoffe erfolgt war. Bei nahezu 100 % (60/61) der Hunde mit respiratorischen Symptomen und bei 96,7 % (87/90) der klinisch gesunden Hunde lagen Informationen zur Impfhistorie vor. Bis auf die intranasale Impfung gegen *B. bronchiseptica* handelte es sich um parenterale Impfstoffe, die subkutan verabreicht wurden.

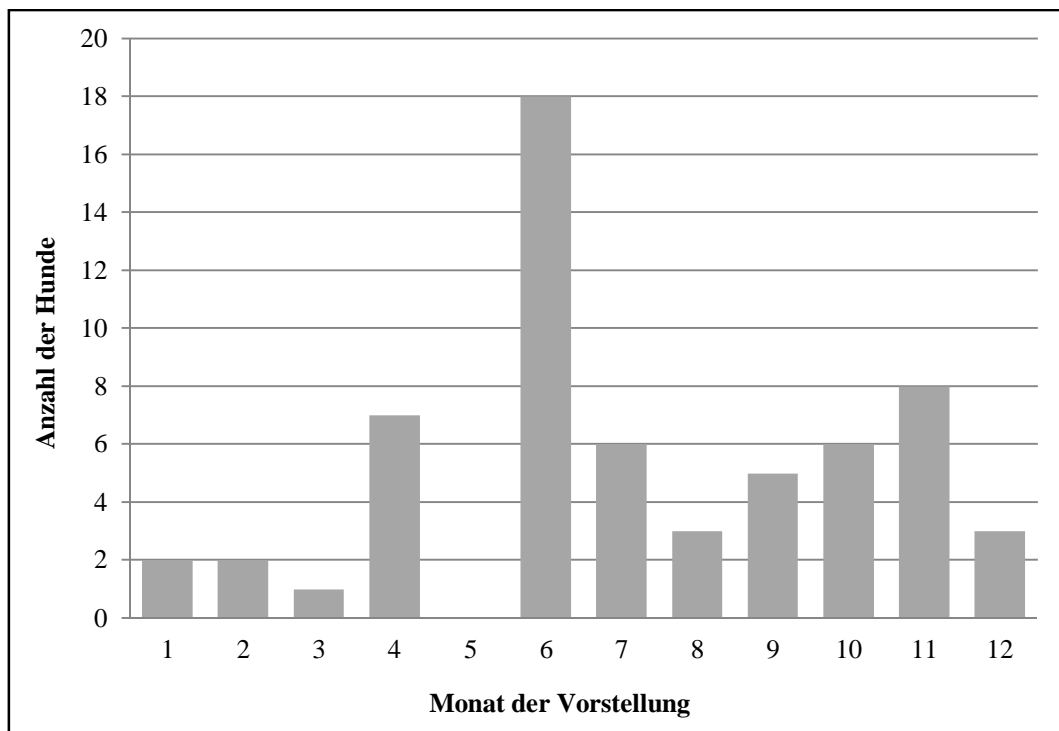
**Tabelle 15: Vorberichtlich erfolgte Impfungen bei respiratorisch kranken und klinisch gesunden Hunden sowie der Vergleich zwischen beiden Gruppen (S = Staupeimpfung, H = Hepatitisimpfung, P = Parvoviroseimpfung, L = Leptospiroseimpfung, T = Tollwutimpfung, Pi = Parainfluenzaimpfung, Bb = intranasale Impfung gegen *Bordetella bronchiseptica*).**

Impfungen	krankte Hunde (n = 60)	gesunde Hunde (n = 87)	p-Wert
<b>SHP + LT</b>	21 (35,0 %)	27 (31,0 %)	0,721
<b>SHPPi + LT</b>	26 (43,3 %)	47 (54,0 %)	0,241
<b>SHPPi + LT + Bb</b>	0	1 (1,1 %)	1,000
<b>keine Impfung</b>	13 (21,7 %)	12 (13,8 %)	0,265

#### 1.4.6. Jahreszeitliches Auftreten von respiratorischen Symptomen

Das Balkendiagramm in Abbildung 5 stellt die jahreszeitliche Verteilung des Vorstellungsmontats der Hunde mit respiratorischen Symptomen grafisch dar. Von den kranken Hunden wurden die meisten (18/61 = 29,5 %) im Juni vorgestellt. Werden die einzelnen Monate zu den vier Jahreszeiten zusammengefasst, ergibt sich folgendes Verteilungsmuster für das jahreszeitliche Auftreten von Atemwegserkrankungen: im Frühling (März ó Mai) traten 13,1 % (8/61) der Fälle mit respiratorischen Symptomen auf, 44,3 % (27/61) der Hunde wurden im Sommer (Juni ó August) in die Studie aufgenommen, und im Herbst (September ó November) wurden 31,1 % (19/61) der Hunde vorgestellt. Im Winter (Dezember ó Februar) präsentierten sich 11,5 % (7/61) der Hunde mit

respiratorischen Symptomen.



**Abbildung 5:** Anzahl der Hunde mit akuten respiratorischen Symptomen, die in den verschiedenen Monaten vorgestellt wurden (1 = Januar, 2 = Februar, 3 = März, 4 = April, 5 = Mai, 6 = Juni, 7 = Juli, 8 = August, 9 = September, 10 = Oktober, 11 = November, 12 = Dezember).

#### 1.4.7. Krankheitsverlauf

Im Durchschnitt wurden die Hunde mit respiratorischen Symptomen an Tag 5,5 und im Median an Tag 3 mit einer Standardabweichung von 4,6 Tagen seit Beginn der Symptomatik vorgestellt. Die Spanne reichte von einem Tag bis zu 14 Tagen.

Informationen über den Krankheitsverlauf bis zum Tag der Vorstellung konnten von 57 Hunden ausgewertet werden. Eine Verschlechterung des Krankheitsverlaufs lag bei 22,8 % (13/57) der respiratorisch kranken Hunde vor. Einen gleichbleibenden Verlauf der Symptomatik wurde bei 50,9 % (29/57) der Patienten beobachtet und eine Verbesserung bei 26,3 % (15/57).

#### 1.4.8. Akute Atemwegssymptome bei Hunden aus der Umgebung

In der Gruppe der respiratorisch kranken Hunde hatten 42,6 % (26/61) vor Beginn

der Symptomatik Kontakt zu Hunden mit akuten Atemwegssymptomen. In der klinisch gesunden Kontrollgruppe waren es nur 18,9 % (17/90). Beim Vergleich der beiden Studiengruppen konnte für diesen Parameter ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p = 0,002$ ).

Bei den respiratorisch kranken Hunden hatten 40,9 % (18/44) der Hunde eine Vorgeschichte von Atemwegssymptomen. Bei den gesunden Hunden wiesen 40,3 % (31/77) der Hunde respiratorische Symptome in der Vergangenheit auf. Von 19,9 % (30/151) der Hunde fehlte die Angabe. Beim Vergleich der beiden Studiengruppen konnte für diesen Parameter kein Unterschied festgestellt werden ( $p = 1,000$ ).



## **2. Methoden**

Anhand eines standardisierten Studienprotokolls wurden bei allen Hunden anamnestische Daten erhoben und bei Hunden mit respiratorischen Symptomen wurden außerdem klinische und labordiagnostische Parameter ermittelt. Bei allen Hunden mit und ohne respiratorische Symptome wurden Tupferproben für die Erregerdiagnostik entnommen.

### **2.1. Studienaufbau**

Bei allen respiratorisch symptomatischen Studientieren erfolgte eine Anamneseerhebung mithilfe eines standardisierten Anamnesebogens, die Durchführung einer klinischen Untersuchung nach standardisiertem Untersuchungsprotokoll, die Entnahme einer Blutprobe zur Durchführung von labordiagnostischen Untersuchungen und die Entnahme von Rachen- und Nasentupferproben zur Untersuchung auf virale Erreger und *B. bronchiseptica*. Bei den klinisch gesunden Hunden wurde nach Studienprotokoll eine Anamneseerhebung und klinische Untersuchung durchgeführt und Tupfer für die Erregerdiagnostik entnommen. Anschließend wurden die für beide Gruppen erhobenen Daten statistisch miteinander verglichen.

### **2.2. Durchgeführte Untersuchungen**

Bei den respiratorisch symptomatischen Hunden erfolgten eine Anamneseerhebung, eine klinische Untersuchung, eine Blutprobenentnahme sowie die Tupferprobenentnahme. Bei den gesunden Hunden entfiel die Blutprobenentnahme.

#### **2.2.1. Klinische Untersuchung**

Bei allen respiratorisch kranken und klinisch gesunden Hunden wurde eine klinische Untersuchung anhand eines standardisierten Untersuchungsbogens (siehe Anhang) durchgeführt, um den Gesundheitsstatus zu evaluieren. Hierbei lag neben der Allgemeinuntersuchung ein besonderer Schwerpunkt auf der Untersuchung des Respirationstrakts. Das Allgemeinbefinden wurde in ungestört, geringgradig (ggr.), mittelgradig (mgr.) und hochgradig (hgr.) gestört eingeteilt. Die Körpertemperatur wurde rektal gemessen und in °C vermerkt. Die Spannweite der physiologischen Körpertemperatur beim Hund wurde aus einer

Studie von Redondo und Mitarbeitern (2012) übernommen und zwischen 38,5 °C und 39,5 °C festgelegt. Weiterhin wurde das Vorhandensein von Nasenausfluss dokumentiert und die Konsistenz des Ausflusses beurteilt. Hierbei erfolgte die Einteilung der Konsistenz in serös, seromukös, mukös, mukopurulent, purulent und hämorrhagisch. Zusätzlich fand die Beurteilung des Hustens nach seiner Qualität statt. War Husten als ein trockener, keuchender Husten erkennbar, wurde er als unproduktiver Husten bezeichnet. Trat der Husten im Zusammenhang mit Auswurf auf, wurde er als produktiver Husten bewertet. Im weiteren Verlauf der klinischen Untersuchung wurden die *Lymphonodi mandibulares* in ihrer Größe beurteilt, Dyspnoe, falls vorhanden, dokumentiert, sowie die Lungenauskultation beurteilt und die Atemfrequenz pro Minute gezählt. Außerdem wurden weitere klinische Auffälligkeiten, wie Augenveränderungen oder Hautveränderungen, festgehalten.

#### **2.2.2. Blutprobenentnahme**

Bei den respiratorisch kranken Hunden wurde jeweils 1 ml Blut freitropfend mittels einer sterilen Einmalkanüle (BD Microlance® 20 G, 0,9 x 40 mm, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) aus der *Vena cephalica antebrachii* oder der *Vena saphena lateralis* in einem EDTA beschichteten 2 Milliliter (ml) Röhrchen (Sarstedt, AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) aufgefangen. Aus den gewonnenen Blutproben wurde ein Blutbild mit Differentialblutbild mithilfe eines Analysegeräts der Firma Sysmex Deutschland GmbH (Norderstedt, Deutschland) erstellt. Dabei wurden die Anzahl der Erythrozyten, Thrombozyten, Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten und der neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten ermittelt. Außerdem wurden im selben Gerät der Hämatokrit und das Hämoglobin bestimmt. Zur Differenzierung der Leukozyten wurde ein Blutaussstrich aus der Blutprobe erstellt, indem ein Blutstropfen auf einen Objektträger (Param GmbH, Hamburg, Deutschland) gegeben und durch gleichmäßige Verteilung mithilfe eines zweiten Objektträgers ausgedünnt wurde. Anschließend erfolgte die Anfärbung des Blutaussstriches mit einer modifizierten Wright-Färbung. Die Auszählung der Zellen erfolgte manuell mit dem 100er Objektiv unter dem Mikroskop durch Zählung der Zellen pro Gesichtsfeld.

#### **2.2.3. Tupferprobenentnahme**

Von allen Hunden wurden jeweils zwei Nasen- und zwei Rachentupfer

entnommen. Hierbei wurden Baumwolltupfer ohne Transportmedium der Firma Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland) verwendet. Der Nasentupfer wurde mindestens 3 cm in den linken oder rechten *Meatus nasi ventralis* eingeführt. Bei der Probenentnahme aus dem Rachen wurde der Baumwolltupfer möglichst tief in den Pharynx eingeführt und ein Abstrich vom weichen Gaumen entnommen.

### **2.3. Erregernachweis**

Aus einem Tupferprobenpaar (ein Nasen- und ein Rachentupfer) wurden die PCR-Nachweise auf virale Erreger durch die Firma IDEXX, Vet Med Labor GmbH in Ludwigsburg, Deutschland, durchgeführt, während das andere Probenpaar bis zur Untersuchung auf *B. bronchiseptica* in Eppendorfröhrchen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei -20 °C asserviert wurde.

#### **2.3.1. Viren**

Der Nachweis der viralen RNA und DNA des CPIV, CAV-2, CIV, CRCoV, CHV und des CDV wurde bei der Firma IDEXX, Vet Med Labor GmbH in Ludwigsburg, Deutschland, durchgeführt. Die durchgeführten PCR wiesen eine Spezifität von nahezu 100 % auf. Der Cut-off Wert lag bei etwa 10 DNA-Kopien.

Die Aufreinigung und Isolierung der Proben erfolgte vollautomatisch mittels QIAamp® Virus BioRobot® (QIAGEN GmbH Germany, Leipzig, Deutschland). Zunächst musste eine Vorbereitung der Tupferproben für den QIAamp® Virus BioRobot® durchgeführt werden. Nasen- und Rachentupfer wurden als eine gemeinsame Probe ausgewertet. Beide Tupfer wurden mit einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) in ein Eppendorfröhrchen überführt. PBS stellte hierbei eine Pufferlösung dar, die aufgrund der verschiedenen Salze eine isotonische Salzlösung bildete. Sie wurde dazu verwendet, die Lebensdauer der immobilisierten Biomoleküle zu verlängern und stellte das Trägermedium für die virale DNA aus den Tupfern dar. Diese Lösung wurde auf eine MicroAmp® 96-Well Reaction Plate übertragen. Die DNA und RNA wurden vollautomatisch durch den QIAamp® Virus BioRobot® isoliert, wobei die gleichen Einzelschritte abliefen, die nachstehend unter 2.3.2.1. für die Aufarbeitung und Isolierung der DNA von *B. bronchiseptica* im Detail erläutert werden.

Damit auch die RNA der RNA-Viren (CPIV, CIV, CRCoV, CDV) amplifiziert werden konnte, musste sie mittels einer Reversen-Transkriptase in eine DNA

umgeschrieben werden. Die Reverse-Transkriptase stellt eine RNA-abhängige DNA-Polymerase dar und überschreibt die RNA-Sequenz in eine DNA. Am Ende der Reaktion lag somit ein RNA/DNA-Hybrid vor. Um nun den zu amplifizierenden DNA-Strang zu erhalten, musste der von der Reversen-Transkriptase neusynthetisierte DNA-Strang mithilfe einer *Taq*-Polymerase komplementär polymerisiert werden. Die Durchführung der real-time PCR verlief analog zur *B.-bronchiseptica*-PCR und erbrachte den Nachweis der viralen DNA durch Messung des eingebauten fluoreszierenden Farbstoffs mit anschließender Schmelzkurvenanalyse.

### 2.3.2. *Bordetella bronchiseptica*

Der Nachweis der *B.-bronchiseptica*-DNA erfolgte im PCR-Labor der Medizinischen Kleintierklinik. Hierzu wurde das Material der bei -20 °C in Eppendorfröhrchen asservierten Nasen- und Rachentupfer untersucht.

#### 2.3.2.1. Aufarbeitung und Isolierung der Desoxyribonukleinsäure

Zur Aufarbeitung und Isolierung der DNA wurde ein QIAamp DNA Micro Kit® (QIAGEN GmbH Germany, Leipzig, Deutschland) verwendet. Für die Isolierung der DNA wurden folgende Substanzen und Reagenzien (Tabelle 16) benötigt:

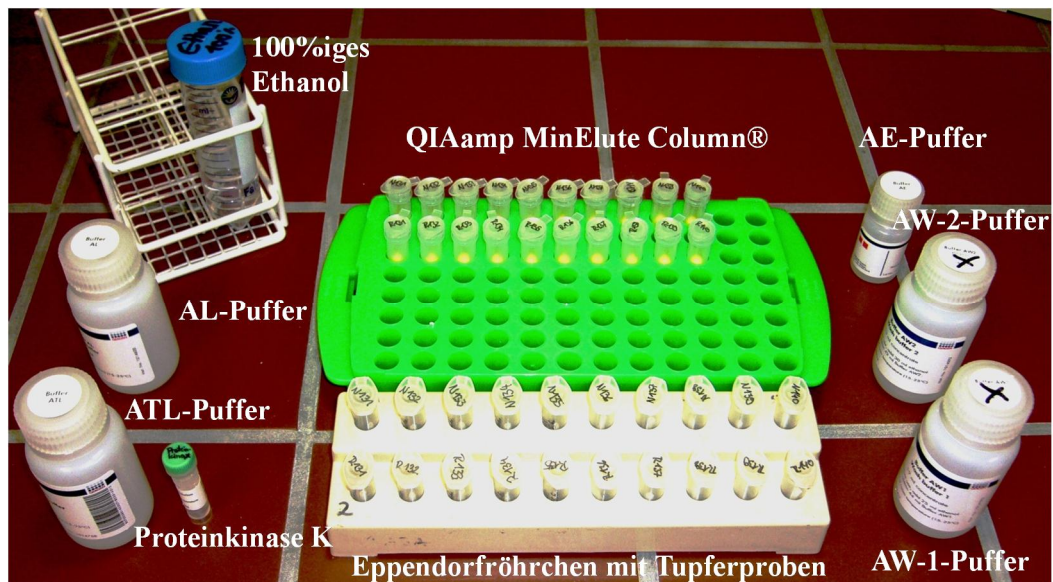
**Tabelle 16: Substanzen und Reagenzien für die Isolierung der Bordetellen-Desoxyribonukleinsäure.**

AE	Tris-EDTA-Puffer zur Eluierung der DNA
AL	Puffer zur Adsorption der DNA an die Silica-Membran
ATL	Puffer zur Gewebslyse
AW 1 und AW 2	Pufferlösungen zur Waschung der DNA
Ethanol	Alkohol zur Unterstützung der DNA-Ausfällung
Proteinkinase K	Enzym zur Lyse der Probe

Durch die Zugabe von Proteinkinase K, einer Endo- und Exopeptidase, und eines ATL-Puffers zu den Baumwolltupfern fand die Lyse der Proben statt. Der Reaktionsansatz wurde für zehn Sekunden gründlich im Mixer VTX-3000L (OMNILAB-Laborzentrum GmbH & Co.KG, Bremen, Deutschland)

durchgemischt und bei 56,0 °C und 900 Umdrehungen pro Minute (rpm) eine Stunde im Thermomixer comfort 1,5 ml (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Danach erfolgten die Zugabe von AL-Puffer und eine gründliche Durchmischung bis sich eine homogene Lösung gebildet hat. Der AL-Puffer basierte auf einem Guanidin-lysierenden Puffer, wobei das Guanidin das Bindeglied der DNA an die Silica-Membran der QIAamp MinElute Column® (QIAGEN GmbH Germany, Leipzig, Deutschland) darstellt und für die Fixierung der DNA an die Membran verantwortlich ist. Zusätzlich beinhaltete der Puffer noch ein Detergens, das die Ruptur von Leukozyten und epithelialem Zellplasma sowie der Zellmembran, die die DNA umgibt, herbeiführte. Die erstellte Lösung wurde bei 70,0 °C und 900 rpm für zehn Minuten im Thermomixer inkubiert und im Anschluss daran in der Eppendorf Zentrifuge 5417 R (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) abzentrifugiert.

Nach Lyse der Proben erfolgte die Zugabe von Ethanol (96 ó 100%ig). Die Aufgabe des Ethanols hierbei war es, das Ionenpotenzial der DNA zu verändern und Wassermoleküle zu beseitigen, so dass es zur Ausfällung der DNA kam. Das Lysat wurde in eine QIAamp MinElute Column® überführt, in der die weiteren Vorkehrungen zur Isolierung der DNA erfolgten. Zunächst wurde durch Zentrifugation die Fixierung der DNA an die Membran des QIAamp MinElute Column® erzielt. Neben der DNA wurden aber auch Störfaktoren (andere Proteine und Salze) an die Silica-Membran gebunden. Um die DNA von diesen Störfaktoren zu bereinigen, erfolgten zwei getrennte Waschungen mit Pufferlösungen (AW 1 und AW 2). Der AW-1-Puffer enthält Guanidinhydrochlorid, das zu einer Denaturierung und Renaturierung von Proteinen führt. Der AW-2-Puffer besteht hauptsächlich aus 70%igem Ethanol, das Salze aus der Membran entfernt. Mithilfe eines AE-Puffers erfolgte im letzten Schritt die Isolierung der an die Membran gebundenen DNA. Der Puffer besteht aus einer Tris-EDTA Lösung, die zum einen die DNA aus der Membran eluiert und zum anderen ein stabiles Lagermedium darstellt. Die isolierte DNA befand sich nach dem letzten Schritt in einem sauberen 1,5-ml-Eppendorfröhrchen und konnte nun mittels PCR nachgewiesen werden. Der Versuchsaufbau zur Isolierung der *B.-bronchiseptica*-DNA wird in Abbildung 6 dargestellt.



**Abbildung 6:** Versuchsaufbau zur Isolierung der *Bordetella-bronchiseptica*-Desoxyribonukleinsäure, links: Substanzen zur Erstellung des Lysats, in der Mitte: QIAamp MinElute Column® mit der Silica-Membran zur Fixierung der Desoxyribonukleinsäure, rechts: Substanzen zur Aufreinigung und Eluierung der Desoxyribonukleinsäure.

#### 2.3.2.2. Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion

Für die Durchführung der real-time PCR für den Nachweis von *B. bronchiseptica* wurde zunächst ein Reaktionsansatz aus Wasser, Primern der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) und SYBR® Green PCR Master Mix (QIAGEN GmbH Germany, Leipzig, Deutschland) erstellt (Tabelle 17).

**Tabelle 17:** Übersicht über die verwendeten Substanzen für die *Bordetella-bronchiseptica*-Polymerase-Kettenreaktion mit den jeweiligen Dosierungen für einen Reaktionsansatz (µl = Mikroliter, pmol = Pikomol).

Substanz	Volumen pro Reaktion
SYBR® Green PCR Master Mix	15,0 µl
Primer forward (25 pmol/µl)	0,2 µl
Primer reverse (25 pmol/µl)	0,2 µl
Wasser	11,6 µl
Template	3,0 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>30,0 µl</b>

Der SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix beinhaltet die Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP), die DNA-Polymerase in Form einer thermostabilen *Thermus-aquaticus*-Polymerase (*Taq*-Polymerase) und SYBR<sup>®</sup> Green (asymmetrischer Cyanin-Farbstoff), das bevorzugt an doppelsträngige DNA bindet und dessen fluoreszierender Farbstoff beim Einbau in die neusynthetisierte DNA gemessen werden kann. Die Primer bestanden aus einem Forward Primer, der die vordere Begrenzung der nachzuweisenden DNA-Matrize bildet und aus einem Reverse Primer, der am hinteren Teil des komplementären DNA-Strangs bindet. Die Primer sind auf dem *fla*-Gen, das nur von *B. bronchiseptica* exprimiert wird, lokalisiert. In Tabelle 18 werden die Basensequenzen der verwendeten Primer dargestellt.

**Tabelle 18: Basenpaar-Abfolge des Forward Primer und des Reverse Primer.**

<b>Forward Primer (22 Basenpaare)</b>	5'CCCCCGCACATTTCGAACTTC3'
<b>Reverse Primer (23 Basenpaare)</b>	5'AGGCTCCCAAGAGAGAAAGGCTT3'

Die Reaktionen der PCR erfolgten auf einer MicroAmp<sup>®</sup> 96-Well Reaction Plate (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland). Zu jedem Reaktionsansatz (27 µl) wurden 3 µl der zuvor isolierten DNA als nachzuweisendes Template hinzugefügt. Ein Well der Platte wurde mit einer negativen Kontrollprobe (NTC) belegt. Nachdem die MicroAmp<sup>®</sup> 96-Well Reaction Plate vollständig belegt war, wurde die PCR mittels Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Real Time PCR System (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die PCR bestand aus insgesamt 40 Zyklen. Jeder Zyklus ließ sich in drei Schritte unterteilen. Zu Beginn der PCR wurde bei einer Temperatur von 95,0 °C die *Taq*-Polymerase aktiviert. Anschließend erfolgte die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei derselben Temperatur in Einzelstränge. Danach fand die Anlagerung der Primer am 3'-Ende bei einer Temperatur von 60,0 °C statt. Bei dieser Temperatur initiierte die *Taq*-Polymerase durch die komplementären Anlagerungen der dNTP die Polymerisierung der DNA. Nach vollständiger Synthese eines neuen Doppelstranges begann ein neuer Zyklus, in dem die Temperatur wieder auf 95,0 °C angehoben wurde und eine wiederholte Denaturierung der neugebildeten DNA-Doppelstränge erfolgte. Durch den Einbau von SYBR<sup>®</sup> Green in die

doppelsträngige DNA während der Polymerisierung zeigte der Farbstoff eine weitaus stärkere Fluoreszenz als ungebundenes SYBR<sup>®</sup> Green. Nach jedem Zyklus konnte somit die Menge an vervielfältigter DNA je nach Intensität der gemessenen Fluoreszenz bestimmt werden. Jedoch lagern auch unspezifische PCR-Produkte diesen Farbstoff ein, so dass nach Ablauf der PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden musste, um zwischen *B. bronchiseptica*-DNA und anderer duplizierter DNA zu unterscheiden. Bei diesem Verfahren wurden die gebildeten DNA-Doppelstränge durch eine kontinuierliche Temperaturerhöhung wieder in DNA-Einzelstränge gespalten. Dabei wurde der zuvor gebundene Farbstoff freigesetzt, und es kam zu einer Abnahme der Fluoreszenz, die durch eine kontinuierliche Messung erkannt werden konnte. Die Schmelztemperatur der verwendeten Primer errechneten sich anhand des Gehaltes der Basen Guanin (G) und Cytosin (C), sowie Thymin (T) und Adenin (A). Als Rechengrundlage wurde die Wallace-Regel herangezogen, die wie folgt definiert ist: Schmelztemperatur ( $T_M$ ) =  $2 \times (A + T) + 4 \times (G + C)$ . Für den Forward Primer und den Reverse Primer errechnete sich somit eine Schmelztemperatur von 70,0 °C. Da unspezifische Amplifikate im Vergleich zur spezifischen *B. bronchiseptica*-DNA einen niedrigeren Schmelzpunkt aufweisen, war eine Unterscheidung zwischen beiden Amplifikaten möglich.

#### 2.3.2.3. Gelelektrophoretischer Nachweis

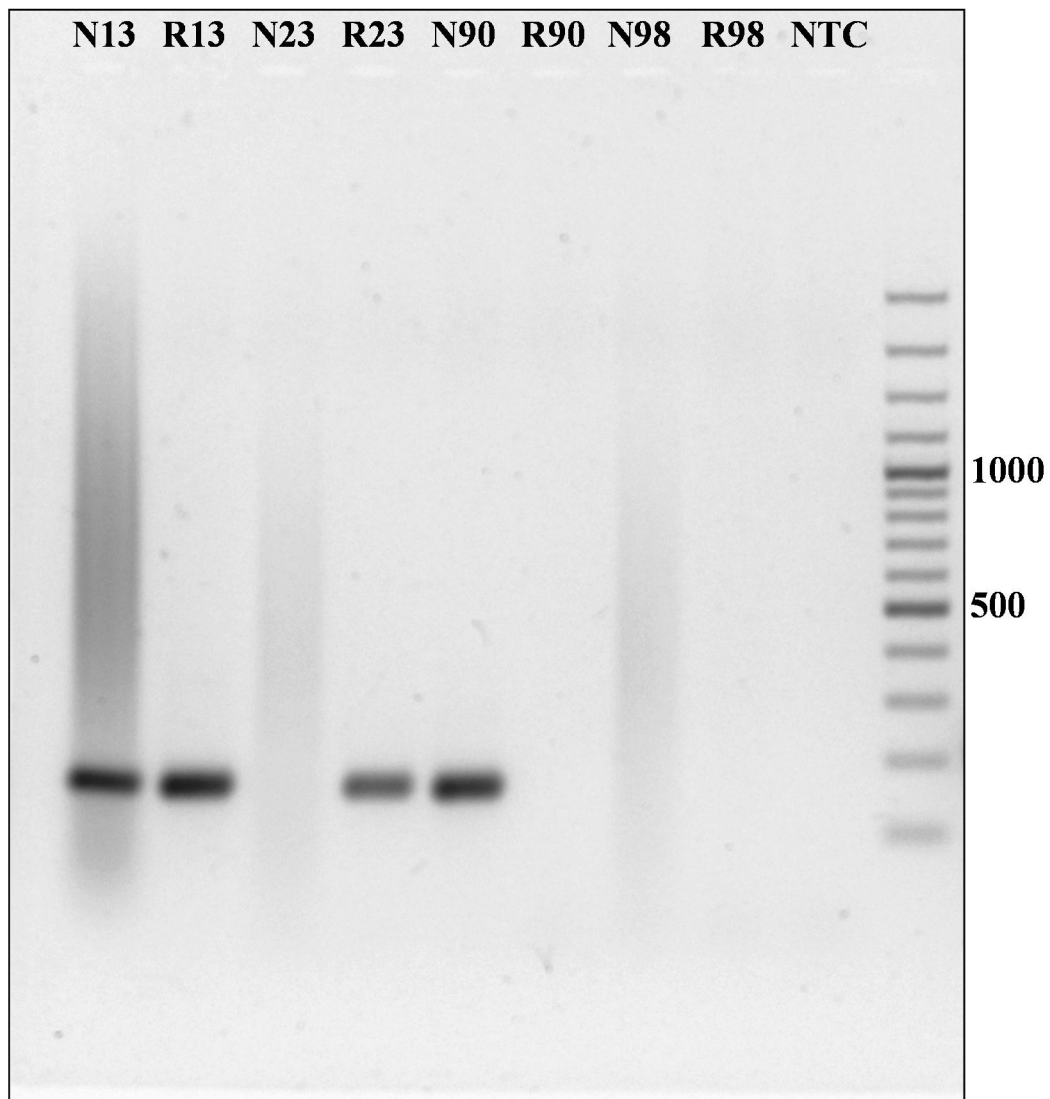
Zur Bestätigung der Ergebnisse der real-time PCR wurde der Erregernachweis mithilfe einer gelelektrophoretischen Auftrennung untersucht. Das Prinzip der elektrophoretischen Auftrennung beruht auf der Ladung der einzelnen Nukleinsäuren. Die Ladung ist proportional zur Größe der Nukleinsäure, da an jeder Monomereinheit eine Ladungseinheit sitzt. Für die relative Mobilität im Agarosegel sind der Siebeffekt und damit die Moleküllänge bestimmend. Der Nachweis der DNA-Fragmente im Agarosegel erfolgte durch die Anfärbung mit einem fluoreszierendem Farbstoff, der nach ultravioletter Anregung sichtbar gemacht werden kann (DINGERMAN, 1999).

Die Herstellung eines 2%igen Agarosegels fand durch die Auflösung der Agarose (Gel LEGQ Agar<sup>®</sup> Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) in einem Trisacetat-EDTA-Puffer (TRIS EDTA Buffer Solution<sup>®</sup>, Fluka Biochemika, Sigma-Aldrich, Buchs, Schweiz) mittels Aufkochen und Verrühren bis zum Erhalt einer klaren



Flüssigkeit statt. Damit die DNA-Banden auf dem Gel später sichtbar gemacht werden konnten, wurde ein Fluoreszenzfarbstoff (GelRed<sup>®</sup> der Firma Genaxxon BioScience GmbH, Ulm, Deutschland) hinzugegeben. Anschließend wurde die hergestellte Lösung in einen Gelträger (Gelkammer, Uniequip, München, Deutschland) gegossen und durch Abkühlen ausgehärtet. Die isolierte und vervielfältigte DNA wurde vor dem Auftragen auf das Gel mit einem Marker (Bromphenolblau der Firma Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) angefärbt. Dieser Farbstoff diente während der Gelelektrophorese als Anhaltspunkt, um zu beurteilen, wie weit die DNA-Fragmente schon aufgetrennt worden waren. Außerdem wurde der Marker in einer separaten Laufstrecke ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Längen der Fragmente des Markers sind bekannt und wurden zur späteren Auswertung der aufgetrennten DNA-Banden herangezogen. Zu den Proben wurde ein Laufpuffer aus Glycerin hinzugegeben, um die Dichte der DNA-Lösung zu erhöhen und dem Herausspülen der Lösung aus den Geltaschen entgegen zu wirken. Das Laufmedium zur Durchführung der gelelektrophoretischen Auftrennung bestand aus dem Trisacetat-EDTA-Puffer, der bereits zur Herstellung des Gels verwendet worden war. Die Gelelektrophorese wurde bei 90 ó 120 Volt über einen Zeitraum von 30 Minuten durchgeführt. Anschließend wurden die DNA-Banden durch ultraviolettes Licht im Digi GEL SYSTEM I<sup>®</sup> (Uniequip, München, Deutschland) sichtbar gemacht und ausgewertet.

Der Nachweis der *B.-bronchiseptica*-DNA mittels PCR erfolgte getrennt nach Nasen- und Rachentupfern. Abbildung 7 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA aus Tupferproben.



**Abbildung 7:** Stichprobenartige Untersuchung der Tupferproben N13, R13, N23, R23, N90, R90, N98, R98 sowie einer negativen Kontrollprobe aus der *Bordetella-bronchiseptica*-Polymerase-Kettenreaktion mithilfe einer gelelektrophoretischen Auftrennung. N13, R13, R23 und N90 weisen ein positives Testergebnis auf. Die Auswertung erfolgt anhand von vorgegebenen Längenstandards des Markers (N = Nasentupfer, R = Rachentupfer, NTC = negative Kontrollprobe).

#### 2.4. Statistische Auswertung

Die Patientendaten wurden kodiert in eine Tabelle von Microsoft® Office Excel® 2007 (Redmond, USA) eingegeben. Zur weiteren statistischen Bearbeitung wurden sie in ein Statistikprogramm überführt. Mithilfe des Statistikprogramms PASW® Statistics 18 (Fa. SPSS Inc, Chicago, USA) erfolgte die Auswertung und die graphische Darstellung der Ergebnisse. Der Vergleich zwischen Patienten- und Kontrollgruppe und zwischen den Gruppen mit unterschiedlichem Erregerstatus hinsichtlich anamnestischer, klinischer und labordiagnostischer

Parameter wurde mit dem zweiseitigen Fisher's Exact Test und dem  $\chi^2$ -Test durchgeführt. Der Vergleich des Alters der respiratorisch kranken und klinisch gesunden Hunde wurde anhand des t-Tests ausgewertet. Das Signifikanzniveau lag für alle Tests bei  $p \leq 0,05$  mit einem KI von 95 %.

## IV. ERGEBNISSE

### 1. Auswertung der Tupferproben

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Erregernachweise für die respiratorisch kranken und klinisch gesunden Hunde dargestellt. Außerdem werden die einzelnen Erregergruppen hinsichtlich anamnestischer Faktoren sowie klinischer und labordiagnostischer Veränderungen miteinander verglichen.

#### 1.1. Prävalenz der Erreger

Insgesamt gingen 61 respiratorisch kranke und 90 klinisch gesunde Hunde in die Studie ein. Bei 85,2 % (52/61) der Hunde mit akuten respiratorischen Symptomen konnten Infektionen mit einem oder mehreren Erregern nachgewiesen werden. Von den Hunden der klinisch gesunden Kontrollgruppe wurden 52,2 % (47/90) positiv getestet.

##### 1.1.1. Viren

In Tabelle 19 werden die einzelnen nachgewiesenen Viren der respiratorisch auffälligen Hunde und der gesunden Hunde dargestellt. Beide Gruppen wurden miteinander verglichen.

**Tabelle 19: Vergleich der Ergebnisse der Virusnachweise mittels Polymerase-Kettenreaktion zwischen Hunden mit akuten respiratorischen Symptomen und klinisch gesunden Hunden. Darstellung der statistisch signifikanten Unterschiede mittels grau unterlegter Felder (CPIV = canines Parainfluenzavirus, CAV = canines Adenovirus, CIV = canines Influenzavirus, CRCoV = canines respiratorisches Coronavirus, CHV = canines Herpesvirus, CDV = canines Staupevirus).**

Erreger	kranken Hunde (n = 61)	gesunde Hunde (n = 90)	p-Wert
<b>CPIV</b>	23 (37,7 %)	7 (7,8 %)	< 0,001
<b>CAV</b>	0	1 (1,1 %)	0,409
<b>CIV</b>	0	0	-
<b>CRCoV</b>	6 (9,8 %)	0	0,002
<b>CHV</b>	0	0	-
<b>CDV</b>	0	0	-

### 1.1.2. *Bordetella bronchiseptica*

Die nachstehende Tabelle 20 vergleicht den Nachweis von *B. bronchiseptica* aus Nasen- und Rachentupfern zwischen respiratorisch kranken und klinisch gesunden Hunden. Die Ergebnisse des *B.-bronchiseptica*-Nachweises basieren hierbei auf den Ergebnissen der PCR, die getrennt nach Nasen- und Rachentupfern ausgewertet wurde. Bei drei Hunden war eine Tupferprobenentnahme aus dem Rachen und bei zwei Hunden aus der Nase nicht möglich.

**Tabelle 20:** Vergleich des Nachweises von *Bordetella bronchiseptica* mittels Polymerase-Kettenreaktion aus Nasen- und Rachentupfern zwischen respiratorisch kranken und klinisch gesunden Hunden. Statistisch signifikante Unterschiede wurden durch grau unterlegte Felder gekennzeichnet (*B. bronchiseptica* = *Bordetella bronchiseptica*, PCR = Polymerase-Kettenreaktion).

Probenmaterial	krankte Hunde (n = 61)	gesunde Hunde (n = 90)	p-Wert
PCR-Rachentupfer <i>B.-bronchiseptica</i> -positiv	40 (69,0 %)	26 (28,9 %)	< 0,001
PCR-Nasentupfer <i>B.-bronchiseptica</i> -positiv	41 (67,2 %)	23 (26,1 %)	< 0,001
PCR-Nasen- und Rachentupfer <i>B.-bronchiseptica</i> -positiv	31 (53,4 %)	7 (8,0 %)	< 0,001
Gesamtergebnis positiv getesteter Hunde	48 (78,7 %)	41 (45,6 %)	< 0,001

### 1.1.3. Mischinfektionen

Mischinfektionen mit einem oder mehreren Erregern konnten bei 37,7 % (23/61) der kranken und 2,2 % (2/90) der klinisch gesunden Hunde nachgewiesen werden. In Tabelle 21 werden die Mischinfektionen getrennt nach den beiden Gruppen dargestellt sowie miteinander verglichen.

**Tabelle 21: Vergleich der Ergebnisse der Erregernachweise der Mischinfektionen mittels Polymerase-Kettenreaktion zwischen Hunden mit akuten respiratorischen Symptomen und klinisch gesunden Hunden. Darstellung der statistisch signifikanten Unterschiede mittels grau unterlegter Felder (CPIV = canines Parainfluenzavirus, CAV = canines Adenovirus, CRCoV = canines respiratorisches Coronavirus, *B. bronchiseptica* = *Bordetella bronchiseptica*).**

Mischinfektion	krankte Hunde (n = 61)	gesunde Hunde (n = 90)	p-Wert
CPIV und CAV	0	1 (1,1 %)	0,409
CPIV und <i>B. bronchiseptica</i>	17 (27,9 %)	1 (1,1 %)	< 0,001
CRCoV und <i>B. bronchiseptica</i>	4 (6,6 %)	0	0,014
CPIV, CRCoV und <i>B. bronchiseptica</i>	2 (3,3 %)	0	0,084

## 1.2. Vergleich der Erregergruppen

Im Folgenden werden die anamnestischen Faktoren sowie klinische und labordiagnostische Veränderungen der einzelnen Erregergruppen verglichen. In die statistische Auswertung gingen nur die Erreger ein, die bei mehr als 5 % der Studienteilnehmer nachgewiesen werden konnten, also CPIV, CRCoV und *B. bronchiseptica*.

### 1.2.1. Signalement

In Tabelle 22 wird der Altersvergleich von respiratorisch kranken und klinisch gesunden Hunden zwischen den verschiedenen Erregergruppen dargestellt.

**Tabelle 22: Darstellung der Altersverteilung in Jahren innerhalb der Erregergruppen von Hunden mit respiratorischen Symptomen und klinisch gesunden Hunden (*B. bronchiseptica* = *Bordetella bronchiseptica*, CPIV = canines Parainfluenzavirus, CRCoV = canines respiratorisches Coronavirus, Min. = Minimum, Max. = Maximum, SD = Standardabweichung).**

Erreger	Alter in Jahren					
	Min.	Max.	Mittelwert	Median	SD	p-Wert
CPIV	0,25	12,00	3,832	3,00	3,314	0,465
CRCoV	0,25	9,00	2,500	1,38	3,225	0,215
<i>B. bronchiseptica</i>	0,25	12,75	3,868	3,00	3,460	0,107

Im Rahmen der Erhebung des Signalements wurde die Geschlechtsverteilung nach Erregergruppen ausgewertet (Tabelle 23).

**Tabelle 23: Geschlechtsverteilung von Hunden mit respiratorischen Symptomen und klinisch gesunden Hunden innerhalb der Erregergruppen sowie im Vergleich (*B. bronchiseptica* = *Bordetella bronchiseptica*, CPIV = canines Parainfluenzavirus, CRCoV = canines respiratorisches Coronavirus).**

Geschlecht	Anzahl von Hunde mit bestimmten Erregerstatus			p-Wert
	CPIV (n = 30)	CRCoV (n = 6)	<i>B. bronchiseptica</i> (n = 89)	
<b>männlich intakt</b>	9 (30,0 %)	4 (66,7 %)	26 (29,2 %)	0,176
<b>männlich kastriert</b>	7 (23,3 %)	0	19 (21,3 %)	0,529
<b>weiblich intakt</b>	8 (26,7 %)	1 (16,7 %)	23 (25,8 %)	1,000
<b>weiblich kastriert</b>	6 (20,0 %)	1 (16,7 %)	21 (23,6 %)	0,925

### 1.2.2. Anamnese

In der Anamnese wird die Herkunft des Hundes evaluiert. In Tabelle 24 werden die Ergebnisse getrennt nach den Erregergruppen aufgeführt.

**Tabelle 24: Herkunft der Hunde mit respiratorischen Symptomen und klinisch gesunden Hunden mit bestimmtem Erregernachweis. Signifikante Unterschiede wurden durch grau unterlegte Felder dargestellt (*B. bronchiseptica* = *Bordetella bronchiseptica*, CPIV = canines Parainfluenzavirus, CRCoV = canines respiratorisches Coronavirus).**

Herkunft	Anzahl von Hunde mit bestimmten Erregerstatus			p-Wert
	CPIV (n = 30)	CRCoV (n = 6)	<i>B. bronchiseptica</i> (n = 89)	
<b>Zucht</b>	9 (30,0 %)	2 (33,3 %)	31 (34,8 %)	0,886
<b>Tierheim</b>	15 (50,0 %)	1 (16,7 %)	23 (25,8 %)	0,037
<b>Tierpension</b>	0	1 (16,7 %)	1 (1,1 %)	0,150
<b>Tierschutz- organisation</b>	3 (10,0 %)	1 (16,7 %)	10 (11,2 %)	0,765
<b>eigener Wurf</b>	2 (6,7 %)	0	20 (22,5 %)	0,080
<b>Fundtier</b>	1 (3,3 %)	1 (16,7 %)	4 (4,5 %)	0,286

Neben der Herkunft des Hundes wurde der Lebensraum des Hundes erhoben. Das Ergebnis wird in Tabelle 25 dargestellt.

**Tabelle 25: Lebensraum der Hunde mit respiratorischen Symptomen und klinisch gesunden Hunden mit bestimmten Erregernachweis (*B. bronchiseptica* = *Bordetella bronchiseptica*, CPIV = canines Parainfluenzavirus, CRCoV = canines respiratorisches Coronavirus).**

Wohnort	Anzahl von Hunde mit bestimmten Erregerstatus			p-Wert
	CPIV (n = 30)	CRCoV (n = 6)	<i>B. bronchiseptica</i> (n = 89)	
<b>Stadt</b>	14 (46,7 %)	3 (50,0 %)	54 (60,7 %)	0,331
<b>Land</b>	15 (50,0 %)	2 (33,3 %)	29 (32,6 %)	0,227
<b>Randgebiet</b>	1 (3,3 %)	0	2 (2,2 %)	1,000
<b>Stadt und Land</b>	0	1 (16,7 %)	4 (4,5 %)	0,145

Weitere mögliche Einflussfaktoren wie der Aufenthalt in einer Einrichtung mit dichter Hundepopulation sowie ein vorangehender Kontakt zu Hunden mit respiratorischen Symptomen werden nach Erregerstatus unterteilt in Tabelle 26 aufgeführt.

**Tabelle 26: Darstellung des Zusammenhangs zwischen Erregerstatus von Hunden mit respiratorischen Symptomen und klinisch gesunden Hunden und dem Kontakt zu Einrichtungen mit dichter Hundepopulation und zu Hunden mit respiratorischen Symptomen (*B. bronchiseptica* = *Bordetella bronchiseptica*, CPIV = canines Parainfluenzavirus, CRCoV = canines respiratorisches Coronavirus).**

anamnestische Faktoren	Anzahl von Hunde mit bestimmten Erregerstatus			p-Wert
	CPIV (n = 30)	CRCoV (n = 6)	<i>B. bronchiseptica</i> (n = 89)	
<b>Einrichtungen mit dichter Hundepopulation</b>	22 (73,3 %)	2 (33,3 %)	63 (70,8 %)	0,161
<b>Kontakt zu respiratorisch kranken Hunden</b>	16 (53,3 %)	2 (33,3 %)	26 (29,2 %)	0,062

In Tabelle 27 wird der Vergleich der respiratorisch kranken und der klinisch gesunden Hunde mit unterschiedlichem Erregerstatus in Bezug auf ihre Kontakttiere aufgeführt.



**Tabelle 27:** Darstellung des Einflusses von Kontakttieren bei der Entwicklung einer Infektion mit den nachgewiesenen Erregern bei respiratorisch kranken und klinisch gesunden Hunden (*B. bronchiseptica* = *Bordetella bronchiseptica*, CPIV = canines Parainfluenzavirus, CRCoV = canines respiratorisches Coronavirus).

Kontakt- tier	Anzahl von Hunde mit bestimmten Erregerstatus			p-Wert
	CPIV (n = 30)	CRCoV (n = 6)	<i>B. bronchiseptica</i> (n = 89)	
<b>Hunde</b>	30 (100 %)	5 (83,3 %)	87 (97,8 %)	0,151
<b>Katzen</b>	3 (10,0 %)	3 (50,0 %)	19 (21,3 %)	0,067
<b>Pferde</b>	3 (10,0 %)	1 (16,7 %)	16 (18,0 %)	0,544
<b>Schweine</b>	0	1 (16,7 %)	1 (1,1 %)	0,150
<b>Kühe</b>	0	1 (16,7 %)	6 (6,7 %)	0,171
<b>Vögel</b>	3 (10,0 %)	1 (16,7 %)	9 (10,1 %)	0,648
<b>Wildtiere</b>	0	1 (16,7 %)	4 (4,5 %)	0,145

In Tabelle 28 ist die Dauer der Atemwegssymptome bis zum Tag der Vorstellung des kranken Hundes für jede Erregergruppe einzeln dargestellt.

**Tabelle 28:** Dauer der Symptomatik in Tagen bis zum Tag der Vorstellung (*B. bronchiseptica* = *Bordetella bronchiseptica*, CPIV = canines Parainfluenzavirus, CRCoV = canines respiratorisches Coronavirus, Min. = Minimum, Max. = Maximum, SD = Standardabweichung).

Erreger	Dauer der Symptomatik in Tagen					p-Wert
	Min.	Max.	Mittel- wert	Median	SD	
<b>CPIV (n = 30)</b>	1	14	4,7	3	4,0	0,290
<b>CRCoV (n = 6)</b>	1	10	4,5	4	3,0	0,595
<b><i>B. bronchiseptica</i> (n = 89)</b>	1	14	5,7	4	4,4	0,503

In Tabelle 29 ist der Krankheitsverlauf der respiratorisch kranken Hunde bis zum Tag der Vorstellung getrennt nach den Erregergruppen angegeben. Von vier Hunden fehlte die Angabe zum Verlauf der Krankheit.

**Tabelle 29: Krankheitsverlauf der Hunde mit respiratorischen Symptomen in Abhängigkeit vom Erregerstatus (*B. bronchiseptica* = *Bordetella bronchiseptica*, CPIV = canines Parainfluenzavirus, CRCoV = canines respiratorisches Coronavirus).**

Krankheitsverlauf	Anzahl von Hunde mit bestimmten Erregerstatus			p-Wert
	CPIV (n = 22)	CRCoV (n = 6)	<i>B. bronchiseptica</i> (n = 48)	
<b>Verschlechterung</b>	5 (21,7 %)	3 (50,0 %)	13 (27,1 %)	0,437
<b>gleichbleibend</b>	12 (52,2 %)	2 (33,3 %)	21 (43,8 %)	0,669
<b>Verbesserung</b>	5 (21,7 %)	1 (16,7 %)	12 (25,0 %)	1,000

Eine Impfung gegen das Parainfluenzavirus wiesen 50,3 % (74/147) der in die Studie eingeschlossenen Hunde auf. Davon konnte bei 18,9 % (14/74) der Hunde das CPIV aus den Tupferproben nachgewiesen werden. Alle 14 geimpften Hunde gehörten zu der Gruppe der respiratorisch kranken Hunde und zeigten klinische Symptome. Insgesamt hatten 49,7 % (73/147) der Hunde keinen Impfschutz gegen das CPIV. Von diesen 73 Hunden hatten 21,9 % (16/73) eine CPIV-Infektion. Der Vergleich der Anzahl der infizierten Tiere in der Gruppe der ungeimpften Hunde mit der Anzahl der infizierten in der Gruppe der geimpften Hunde ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,687$ ). Alle sieben CPIV-positiven klinisch gesunden Hunde wiesen keinen Impfschutz gegen das CPIV auf. Von vier Hunden fehlten Informationen zur Impfhistorie. Eine Impfung gegen *B. bronchiseptica* wies ein gesunder Hund auf, welcher in den Tupferproben *B.-bronchiseptica*-positiv getestet wurde.

Tabelle 30 stellt die jahreszeitliche Verteilung des Vorstellungszeitpunkts der respiratorisch kranken Hunde mit einem bestimmten Erregerstatus dar.

**Tabelle 30: Jahreszeitliche Verteilung des Vorstellungszeitpunkts der respiratorisch kranken Hunde mit einem bestimmten Erregerstatus (*B. bronchiseptica* = *Bordetella bronchiseptica*, CPIV = canines Parainfluenzavirus, CRCoV = canines respiratorisches Coronavirus).**

Monat	Anzahl von Hunde mit bestimmten Erregerstatus			p-Wert
	CPIV (n = 23)	CRCoV (n = 6)	<i>B. bronchiseptica</i> (n = 48)	
<b>Januar</b>	1 (4,3 %)	1 (16,6 %)	1 (2,1 %)	0,150
<b>Februar</b>	0	0	2 (4,2 %)	1,000
<b>März</b>	1 (4,3 %)	0	0	0,377
<b>April</b>	2 (8,7 %)	1 (16,6 %)	6 (12,5 %)	0,865
<b>Mai</b>	0	0	0	-
<b>Juni</b>	6 (26,1 %)	0	10 (20,8 %)	0,506
<b>Juli</b>	2 (8,7 %)	0	6 (12,5 %)	1,000
<b>August</b>	2 (8,7 %)	1 (16,6 %)	3 (6,25 %)	0,384
<b>September</b>	1 (4,3 %)	0	5 (10,4 %)	0,792
<b>Oktober</b>	4 (17,4 %)	1 (16,6 %)	6 (12,5 %)	0,783
<b>November</b>	3 (13,0 %)	2 (33,3 %)	6 (12,5 %)	0,325
<b>Dezember</b>	1 (4,3 %)	0	3 (6,25 %)	1,000

### 1.2.3. Klinische Untersuchung

Eine klinische Untersuchung konnte bei 73,8 % (45/61) der respiratorisch kranken Hunde durchgeführt werden. In Tabelle 31 werden die klinischen Veränderungen dargestellt.

**Tabelle 31: Befunde der klinischen Untersuchung bei respiratorisch kranken Hunden (ggr. = geringgradig, mgr. = mittelgradig, hgr. = hochgradig).**

klinische Veränderung		kranke Hunde (n = 45)
Allgemeinbefinde	ungestört	32 (71,1 %)
	ggr. gestört	9 (20,0 %)
	mgr. gestört	4 (8,9 %)
	hgr. gestört	0
Nasenausfluss	nicht vorhanden	17 (37,8 %)
	serös	21 (46,7 %)
	seromukös	0
	mukös	1 (2,2 %)
	mukopurulent	4 (8,9 %)
	purulent	2 (4,4 %)
	hämorrhagisch	0
Husten	nicht vorhanden	6 (13,3 %)
	unproduktiv	17 (37,8 %)
	produktiv	22 (48,9 %)
Niesen	nicht vorhanden	33 (73,3 %)
	vorhanden	12 (26,7 %)
<i>Lymphonodi mandibulares</i>	physiologisch	28 (62,2 %)
	vergrößert	17 (37,8 %)
Dyspnoe	nicht vorhanden	42 (93,3 %)
	vorhanden	3 (6,7 %)
Lungenauskultation	unauffällig	26 (57,8 %)
	verändert	19 (42,2 %)
weitere Symptome	gastrointestinale Symptome	11 (24,4 %)
	ophthalmologische Symptome	1 (2,2 %)
	dermatologische Symptome	2 (4,4 %)

Die Veränderungen der respiratorischen Symptome wurden auch nach Anstrengung evaluiert. Hierbei verschlechterte sich bei 39,3 % (24/61) der respiratorisch kranken Hunde die Symptomatik bei Anstrengung. In Tabelle 32 wird die Auswertung der Körpertemperatur der respiratorisch kranken Hunde dargestellt. Es lagen Messwerte von 44 Hunden vor.

**Tabelle 32: Rektale Körpertemperatur von Hunden mit akuten respiratorischen Symptomen (n = 44) in Grad Celsius (°C) (Min. = Minimum, Max. = Maximum, SD = Standardabweichung).**

	Min.	Max.	Mittelwert	Median	SD
<b>Körpertemperatur (°C)</b>	37,4	40,2	38,87	38,8	0,54

Die Ergebnisse der klinischen Untersuchung werden in Abhängigkeit vom Erregerstatus der Hunde mit respiratorischen Symptomen sowie im Vergleich in Tabelle 33 dargestellt.

**Tabelle 33: Ergebnisse der klinischen Veränderungen in Abhängigkeit vom Erregerstatus der Hunde mit respiratorischen Symptomen sowie im Vergleich (*B. bronchiseptica* = *Bordetella bronchiseptica*, CPIV = canines Parainfluenzavirus, CRCoV = canines respiratorisches Coronavirus).**

klinische Veränderungen	Anzahl der Patienten mit bestimmtem Erregerstatus			p-Wert
	CPIV (n = 17)	CRCoV (n = 6)	<i>B. bronchiseptica</i> (n = 39)	
gestörtes Allgemeinbefinden	6 (35,3 %)	1 (16,7 %)	11 (28,2 %)	0,762
Fieber	3 (17,6 %)	1 (16,7 %)	5 (12,8 %)	0,869
unproduktiver Husten	5 (29,4 %)	2 (33,3 %)	12 (30,8 %)	1,000
produktiver Husten	9 (52,9 %)	3 (50,0 %)	21 (53,8 %)	1,000
Nasenausfluss	12 (70,6 %)	4 (66,7 %)	25 (64,1 %)	0,918
Niesen	4 (23,5 %)	1 (16,7 %)	10 (25,6 %)	1,000
Dyspnoe	2 (11,8 %)	2 (33,3 %)	3 (7,7 %)	0,156
vergrößerte Lymphonodi mandibulares	8 (47,1 %)	2 (33,3 %)	16 (41,0 %)	0,859
veränderte Lungenauskultation	6 (35,3 %)	2 (33,3 %)	15 (38,5 %)	1,000
gastrointestinale Symptome	5 (29,4 %)	0	6 (15,4 %)	0,223
dermatologische Symptome	1 (5,9 %)	0	1 (2,6 %)	0,608
ophthalmologische Symptome	4 (23,5 %)	1 (16,7 %)	5 (12,8 %)	0,584

---

**1.2.4. Labordiagnostische Untersuchung**

Ein Blutbild und ein Differentialblutbild wurden bei 65,6 % (40/61) der Hunde mit Atemwegssymptomen erstellt. Die Laborwerte werden in Tabelle 34 dargestellt. In Tabelle 35 werden die veränderten Laborparameter der Hunde mit unterschiedlichem Erregerstatus miteinander verglichen.

**Tabelle 34: Darstellung von Mittelwert, Median, Spannweite und Standardabweichung der Blutbildparameter der Hunde mit respiratorischen Symptomen (n = 40) sowie Anzahl und Prozentwerte der Ergebnisse unterhalb und oberhalb des Referenzbereichs (Min. = Minimum, Max. = Maximum, SD = Standardabweichung, l = Liter, l/l = Liter pro Liter, mmol/l = Millimol pro Liter).**

Parameter	Werte unterhalb des Referenz- bereichs	Werte oberhalb des Referenz- bereichs	Min.	Max.	Mittelwert	Median	SD	Referenzbereich und Einheit
Leukozyten	1 (2,5 %)	5 (12,5 %)	4,77	30,76	12,169	10,74	5,375	5,00 ó 16,00 x 10 <sup>9</sup> /l
Erythrozyten	5 (12,5 %)	0 (0 %)	4,10	8,40	6,606	6,53	0,919	5,50 ó 9,30 x 10 <sup>12</sup> /l
Hämoglobin	2 (5,0 %)	0 (0 %)	5,90	12,40	9,772	9,75	1,446	7,44 ó 12,50 mmol/l
Hämatokrit	3 (7,5 %)	0 (0 %)	0,28	0,54	0,437	0,43	0,061	0,35 ó 0,58 l/l
Thrombozyten	5 (12,5 %)	2 (5,0 %)	115	704	305,0	289	127,9	180 ó 550 x 10 <sup>9</sup> /l
stabkernige neutrophile Granulozyten	0 (0 %)	3 (7,5 %)	1,49	1,85	1,620	1,52	0,200	0 ó 0,50 x 10 <sup>9</sup> /l
segmentkernige neutrophile Granulozyten	2 (5,0 %)	12 (30,0 %)	0,91	24,3	8,063	7,24	4,202	3,00 ó 9,00 x 10 <sup>9</sup> /l
eosinophile Granulozyten	2 (5,0 %)	9 (22,5 %)	0,02	2,28	0,470	0,38	0,413	0,04 ó 0,60 x 10 <sup>9</sup> /l
basophile Granulozyten	0 (0 %)	11 (27,5 %)	0,00	0,26	0,042	0,03	0,046	0 ó 0,04 x 10 <sup>9</sup> /l
Lymphozyten	0 (0 %)	11 (27,5 %)	1,00	6,77	2,825	2,51	1,382	1,00 ó 3,60 x 10 <sup>9</sup> /l
Monozyten	1 (2,5 %)	23 (57,5 %)	0,02	3,08	0,853	0,60	0,769	0,04 ó 0,50 x 10 <sup>9</sup> /l

**Tabelle 35: Vergleich der Laborparameter der respiratorisch kranken Hunde mit unterschiedlichem Erregerstatus (*B. bronchiseptica* = *Bordetella bronchiseptica*, CPIV = canines Parainfluenzavirus, CRCoV = canines respiratorisches Coronavirus).**

Laborparameter	Anzahl der Patienten mit bestimmtem Erregerstatus			p-Wert
	CPIV (n = 17)	CRCoV (n = 6)	<i>B. bronchiseptica</i> (n = 39)	
<b>Leukozyten</b>	2 (11,8 %)	0	6 (15,4 %)	0,861
<b>Erythrozyten</b>	3 (17,6 %)	1 (16,7 %)	5 (12,8 %)	0,869
<b>Hämoglobin</b>	2 (11,8 %)	0	2 (5,1 %)	0,721
<b>Hämatokrit</b>	2 (11,8 %)	0	3 (7,7 %)	0,784
<b>Thrombozyten</b>	4 (23,5 %)	0	7 (17,9 %)	0,604
<b>stabkernige neutrophile Granulozyten</b>	3 (17,6 %)	0	3 (7,7 %)	0,401
<b>segmentkernige neutrophile Granulozyten</b>	8 (47,1 %)	1 (16,7 %)	13 (33,3 %)	0,362
<b>eosinophile Granulozyten</b>	3 (17,6 %)	2 (33,3 %)	8 (20,5 %)	0,790
<b>basophile Granulozyten</b>	4 (23,5 %)	1 (16,7 %)	10 (25,6 %)	1,000
<b>Lymphozyten</b>	5 (29,4 %)	1 (16,7 %)	11 (28,2 %)	1,000
<b>Monozyten</b>	11 (64,7 %)	2 (33,3 %)	21 (53,8 %)	0,464



## V. DISKUSSION

Akute respiratorische Infektionen im Rahmen des CIRDC-Komplexes können durch einen oder mehrere Erreger verursacht werden. Mögliche Pathogene, denen eine ätiologische Beteiligung an diesem Komplex zugesprochen wird, sind das CPiV, das CAV-2, das CHV, das CDV und *B. bronchiseptica* (BEMIS et al., 1977c; BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007). In den letzten Jahren konnten weitere virale Erreger bei Hunden mit Atemwegsinfektionen nachgewiesen werden, deren Rolle als primäre Pathogene jedoch bisher nicht umfassend geklärt ist. Zu diesen Erregern gehören das CIV und das CRCoV (MOCHIZUKI et al., 2008).

Der CIRDC-Komplex stellt ein weltweites Problem dar und gehört zu den häufigsten Infektionskrankheiten in der Hundepopulation (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007). Da dieser Krankheitskomplex aufgrund der hohen Kontagiosität seiner Erreger das Potenzial hat, in Hundepopulationen endemisch zu werden (APPEL & BINN, 1987a), ist es besonders für praktizierende Tierärzte wichtig, sich mit diesem Krankheitsbild und seinen verschiedenen Erregerkomponenten vertraut zu machen. Zusätzlich zur klassischen Zwingerhustensymptomatik besteht bei empfänglichen Individuen auch die Gefahr, dass es durch Sekundärinfektionen zur Entstehung schwerer Bronchopneumonien kommen kann (APPEL & BINN, 1987a).

In Deutschland wurden noch keine Studien durchgeführt, die die Bedeutung der bisher bekannten Erreger des CIRDC-Komplexes untersuchen. Ziel der vorliegenden Studie war somit, das Vorkommen der potenziellen ätiologischen Erreger CPiV, CAV-2, CIV, CRCoV, CHV, CDV und *B. bronchiseptica* bei respiratorisch kranken und klinisch gesunden Hunden in Deutschland zu untersuchen. Im Rahmen der Studie wurden neben Hunden mit respiratorischen Symptomen auch klinisch gesunde Hunde auf potenzielle Atemwegserreger untersucht, um eine Aussage über mögliche asymptomatische Träger machen zu können.

Das CPiV wird seit fast 50 Jahren als ein wichtiger Faktor bei der Entstehung des CIRDC-Komplexes angesehen (ELLIS & KRAKOWKA, 2012). Durch die Zerstörung des zilienträgenden Epithels des Atmungstrakts bildet der Erreger eine

wichtige Grundlage für sekundäre Infektionen des Respirationstrakts. Einige Autoren gehen davon aus, dass das Virus selbst nur zu unkomplizierten subklinischen bis moderaten Infektionen führt (TIZARD, 2009). Kurz nach Entdeckung des Virus stand bereits ein Impfstoff gegen das CPIV zur Verfügung. Dies ließ manche Autoren spekulieren, dass dem Virus aus diesem Grund keine größere Aufmerksamkeit gewidmet wurde, da man ihm in geimpften Hundepopulationen keine Bedeutung mehr zusprach (ELLIS & KRAKOWKA, 2012).

In der vorliegenden Studie konnte das CPIV bei 37,7 % (23/61) der respiratorisch kranken Hunde nachgewiesen werden, wovon allerdings nur 17,4 % (4/23) der Hunde eine Monoinfektion mit dem CPIV aufwiesen. Das Virus konnte auch bei 7,8 % (7/90) der klinisch gesunden Hunde aus Nasen- und Rachentupfern mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Folglich scheint das Virus signifikant an der Ausbildung akuter respiratorischer Infektionen beteiligt zu sein. Außerdem kann die Aussage bestätigt werden, dass die meisten natürlichen Infektionen mit dem CPIV Mischinfektionen sind (APPEL & PERCY, 1970).

Die sieben in der vorliegenden Studie CPIV-positiv getesteten, klinisch gesunden Hunde hatten alle vorberichtlich Kontakt zu respiratorisch auffälligen Hunden. Bei fünf der sieben Hunde konnte das CPIV ohne Beteiligung weiterer Erreger isoliert werden. Eine Monoinfektion mit dem CPIV kann neben subklinischen Infektionen auch milde respiratorische Symptome hervorrufen (APPEL & BINN, 1987b). Da bei den in der vorliegenden Studie klinisch gesunden Hunden mit einer CPIV-Infektion keine weiteren Verlaufsuntersuchungen durchgeführt wurden, bleibt unklar, ob diese Hunde zu einem späteren Zeitpunkt Symptome entwickelten oder ob tatsächlich eine subklinische Infektion vorlag.

Im Vergleich zur vorliegenden Studie, in der 37,7 % der respiratorisch kranken Hunde eine CPIV-Infektion aufwiesen, konnte der Erreger in einer japanischen Studie nur bei 7,4 % (5/68) von Hunden mit respiratorischen Symptomen mittels RT-PCR aus Nasentupfern isoliert werden (MOCHIZUKI et al., 2008); somit scheint das CPIV ein unterschiedliches geografisches Verteilungsmuster aufzuweisen.

Hunde, die in der vorliegenden Studie CPIV-positiv getestet wurden, hatten

keinen signifikant häufigeren Kontakt zu Hunden mit respiratorischen Symptomen als Hunde mit anderen Infektionserregern. Dass das CPIV durch eine hohe Kontagiosität charakterisiert ist, kann demnach nicht bestätigt werden (BINN et al., 1970b). Das Auftreten einer CPIV-Infektion korreliert mit der Dichte der Hundepopulation, da auf diese Weise das Virus schnell weiterverbreitet werden und ein Großteil der Hunde in kurzer Zeit eine Infektion entwickeln kann (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007). In der vorliegenden Studie galt der Aufenthalt des Hundes in dichten Hundepopulationen jedoch nicht als Voraussetzung zur Entwicklung einer CPIV-Infektion. Mögliche Gründe hierfür können sein, dass ein solcher Aufenthalt bereits länger als acht bis zehn Tage zurückliegen könnte und somit ein Nachweis des CPIV nicht mehr möglich wäre (ROSENBERG et al., 1971). Bei vielen Studienteilnehmern fehlten Angaben zum Zeitpunkt des Aufenthaltes in Hundepopulationen. Auch können Katzen mit dem CPIV infiziert werden, ohne selbst daran zu erkranken und stellen so ein mögliches Erregerreservoir für Hunde dar (BLACK & LEE, 1970). In der vorliegenden Studie konnte kein Zusammenhang zwischen einer CPIV-Infektion und Katzenkontakt hergestellt werden; hier wären weitere Untersuchungen wünschenswert, um mögliche prädisponierende Faktoren näher zu untersuchen.

Durch experimentelle CPIV-Infektionen wurden keine oder nur milde klinische Symptome ausgelöst (APPEL & BINN, 1987b). Als Kardinalsymptom gilt ein trockener und keifender Husten (APPEL & BINN, 1987a). Bei der Auswertung der klinischen Untersuchung konnten in der vorliegenden Studie keine typischen Symptome mit dem CPIV in Zusammenhang gebracht werden. Eine Infektion trat sowohl mit ungestörtem Allgemeinbefinden oder mit milden Symptomen wie, Husten und serösem Nasenausfluss auf, als auch mit schwereren Symptomen, wie gestörtem Allgemeinbefinden, Fieber und veränderten Lungenauskultationsbefunden auf. Schwere klinische Symptome wurden in der Literatur beschrieben, wenn eine CPIV-Infektion mit einer weiteren viralen oder bakteriellen Infektion vergesellschaftet ist (BINN et al., 1979). In der vorliegenden Studie konnte dagegen kein schwererer Krankheitsverlauf mit CPIV-Mischinfektionen in Verbindung gebracht werden.

Die Studie zeigt, dass auch bei regelmäßig gegen das CPIV geimpften Hunden eine Infektion mit dem Virus differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden muss wenn respiratorische Symptome auftreten. Bei 50,3 % (74/147) der Hunde

lag eine parenterale Impfung gegen das CPIV vor. Von diesen 74 Hunden konnte bei 18,9 % (14/74) eine Infektion mit dem CPIV nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu war bei 28,1 % (16/73) der CPIV-ungeimpften Hunde der Virusnachweis positiv. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit einer CPIV-Infektion zwischen CPIV-geimpften und ungeimpften Hunden festgestellt werden. Auch Erles und Mitarbeiter (2004) konnten aus 10,0 % der Lungen- (11/106) und aus 20,0 % der Tracheaspülproben (33/170) von respiratorisch symptomatischen Hunden, die eine parenterale Impfung gegen das CPIV erhalten hatten, das Virus mittels RT-PCR finden. Eine parenterale CPIV-Impfung ist somit nicht in der Lage, eine Infektion und Ausscheidung des Virus und offenbar auch nicht die Ausbildung von klinischen Symptomen zu verhindern. Jacobs und Mitarbeiter (2005) konnten in einer Studie nachweisen, dass ein intranasaler Lebendimpfstoff gegen das CPIV und *B. bronchiseptica* zur Reduktion der Erregerausscheidung führen kann. Hierbei wurden das CPIV und *B. bronchiseptica* nach experimenteller Infektion zuvor intranasal geimpfter und ungeimpfter Kontrollhunde aus Nasen- und Rachentupfern quantitativ nachgewiesen. Sowohl die klinischen Symptome, als auch die ausgeschiedene Erregermenge waren bei den geimpften Hunden milder und geringer. Die Verwendung eines intranasalen Impfstoffes könnte die lokale Immunabwehr stimulieren und die Erregerausscheidung reduzieren, was zur Verringerung der Ausbreitung des Virus innerhalb der Hundepopulation beitragen könnte. Diese Form der Impfung könnte somit vor allem bei Hunden, die in dichten Hundepopulationen gehalten werden, wie in Tierheimen und Tierpensionen, durchgeführt werden, um den Infektionsdruck durch die Erregerausscheidung zu reduzieren. Um die Vorteile eines intranasalen Impfstoffes im Vergleich zur parenteralen Vakzine beurteilen zu können, sind jedoch vergleichende Studien nötig.

Das CAV-2 wurde als ein Hauptverursacher des CIRDC-Komplexes angesehen (FORD, 2006), scheint aber aufgrund der weit verbreiteten Impfung mittlerweile an Bedeutung verloren zu haben (DECARO et al., 2008). In der vorliegenden Studie wurde das CAV-2 bei keinem Hund mit respiratorischen Symptomen, jedoch bei einem klinisch gesunden Hund nachgewiesen. Das CAV-2 scheint in der untersuchten deutschen Hundepopulation bei der Ausbildung von respiratorischen Infektionen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Es ist

möglicherweise durch die Impfung aus der deutschen Hundepopulation weitestgehend eliminiert worden. Im Vergleich dazu wurde das CAV-2 in Japan bei 2,9 % (2/68) der Hunde mit Atemwegsinfektionen mittels PCR in der Nasenhöhle gefunden (MOCHIZUKI et al., 2008). In England konnte ebenfalls in keiner der in einer Studie untersuchten 29 Tracheal- und 34 Lungenspülproben CAV-2 bei geimpften Hunden mit respiratorischen Symptomen nachgewiesen werden (ERLES et al., 2004).

In der Türkei waren in 87,2 % (82/94) der Serumproben bei ungeimpften klinisch gesunden adulten Hunden Antikörper gegen CAV-1 und CAV-2 nachweisbar (GUR & ACAR, 2009). Dies bedeutet, dass CAV in der türkischen Hundepopulation zirkuliert und Infektionen hervorrufen kann. In der untersuchten deutschen Hundepopulation scheint die Impfung gegen das CAV effektiv in der Bekämpfung der Virusausbreitung zu sein. Dennoch erscheint es wichtig, eine regelmäßige Impfung durchzuführen, da das CAV durch den globalen Hundetransport aus Ländern mit Hinweisen auf eine CAV-Zirkulation, wie der Türkei, nach Deutschland importiert werden kann.

Das CIV wird seit seiner Entdeckung im Jahr 2004 als ein Primärerreger von akuten respiratorischen Infektionen beim Hund diskutiert (CRAWFORD et al., 2005). Die geografische Verbreitung des Virus scheint jedoch derzeit hauptsächlich auf die USA und Korea beschränkt zu sein (DUBOVI, 2010). In der vorliegenden Studie konnte CIV mittels PCR in keiner der Nasen- und Rachentupferproben von respiratorisch kranken und gesunden Hunden nachgewiesen werden. Eine speziesübergreifende Übertragung, wie in den USA vom Pferd auf den Hund (CRAWFORD et al., 2005) und in Korea vom Vogel auf den Hund (SONG et al., 2008), wurde bislang in Deutschland noch nicht dokumentiert. Allerdings kann der Nachweis einer CIV-Infektion über einen direkten Erregernachweis aus Nasen- und Rachentupfern schwierig sein, da die höchste Virusausscheidung bereits in der präklinischen Phase während der zwei- bis viertägigen Inkubationszeit stattfindet und in den darauffolgenden Tagen rasch abfällt, so dass es zur Einstellung der Virusausscheidung nach sieben bis zehn Tagen kommt (DESHPANDE et al., 2009). In der vorliegenden Studie wurden die kranken Hunde im Durchschnitt an Tag 5,5 nach Auftreten respiratorischer Symptome vorgestellt, was für den Nachweis einer CIV-Infektion bereits zu spät sein könnte. Eine Tupferprobenentnahme müsste folglich in einer sehr frühen

Phase der Infektion erfolgen. Zum Nachweis einer CIV-Infektion sollte, wie in der vorliegenden Studie erfolgt, die RT-PCR gewählt werden, da sie bereits geringe Virusmengen nachweisen kann und somit im Vergleich zum Antigen-ELISA eine sensitivere Methode darstellt (CRAWFORD et al., 2005). Auch bei Patienten, die sich bereits in der Phase des Abfalls der Virusausscheidung befinden, könnte der Erreger mit dieser Nachweismethode möglicherweise noch erfolgreich gefunden werden. Es konnte jedoch trotz Auswahl dieses Analyseverfahrens in der vorliegenden Studie kein positiver CIV-Nachweis verzeichnet werden. Sollte auch nach negativem Erregernachweis der Verdacht auf eine CIV-assoziierte Infektion des Respirationstrakts bestehen, wäre es ratsam, einen Antikörpernachweis aus einem Serumpaar durchzuführen (DUBOVI & NJAA, 2008).

Auch wenn in Deutschland bisher keine Fälle von CIV-induzierten respiratorischen Infektionen beim Hund dokumentiert wurden, sollte die Möglichkeit einer Infektion mit diesem Erreger nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die schnelle Bildung neuer Genvarianten ermöglicht es dem Virus, rasche transspezifische Übertragungen durchzuführen und Epidemien auszulösen, die auch für den Menschen eine Bedrohung darstellen könnten (DOMINGO & HOLLAND, 1997).

In der vorliegenden Studie konnte auch das CRCoV bei 9,8 % (6/61) der Hunde mit respiratorischer Symptomatik isoliert werden. Das CRCoV wurde 2003 erstmals aus dem Respirationstrakt von Hunden mit Atemwegssymptomen nachgewiesen (ERLES et al., 2003). In der gesunden Kontrollgruppe wurde kein CRCoV gefunden. Dies zeigt, dass das CRCoV auch bei deutschen Hunden signifikant an der Entwicklung akuter respiratorischer Infektionen beteiligt ist.

In England, Italien und Korea wurden Studien durchgeführt, bei denen ein Nachweis des CRCoV aus Trachea- oder Lungenspülproben von Hunden mittels RT-PCR erfolgte. Hierbei wurde das CRCoV in England in 26,9 % (32/119) der Trachealspülproben und 16,8 % (20/119) der Lungenspülproben von Hunden mit milden respiratorischen Symptomen detektiert (ERLES et al., 2003). In Italien gelang der CRCoV-Nachweis aus einer Lungenspülprobe von 109 euthanasierten Hunden (DECARO et al., 2007). In Korea wiesen 2,8 % (3/109) der Tracheal- und Lungenspülproben CRCoV auf (AN et al., 2010b). Auch in Japan wurden 96

Hunde mit gastrointestinalen und/oder respiratorischen Symptomen durch die Entnahme von Rachen-, Nasen-, Konjunktival- und Rektaltupfern mittels RT-PCR auf CRCoV untersucht. Bei 2,1 % (2/96) der Proben war CRCoV nachweisbar, wobei ein Nachweis aus der Nase und ein Nachweis aus dem Rektum erfolgte (YACHI & MOCHIZUKI, 2006).

Die unterschiedliche Prävalenz des CRCoV in diesen vier Studien wird möglicherweise durch die Auswahlkriterien der Probanden beeinflusst. In die Studie von Erles und Mitarbeitern (2003) wurden asymptomatische und respiratorisch kranke Hunde eingeschlossen und entsprechend des Schweregrades der Symptome in vier Gruppen eingeteilt, während in den Studien von An und Mitarbeitern (2010a) und Decaro und Mitarbeitern (2007) neben Hunden mit respiratorischen Symptomen auch Hunde mit dermatologischen, gastrointestinalen und anderen Symptomen eingeschlossen wurden. In der Studie von Yachi und Mitarbeitern (2006) wurden neben respiratorisch auffälligen Hunden ebenfalls Hunde mit gastrointestinalen Symptomen eingeschlossen. Die höhere Prävalenz des CRCoV in der Studie aus England gegenüber den Untersuchungen aus Italien, Korea und Deutschland kann möglicherweise darauf zurückzuführen sein, dass England als potenzieller Ursprungsort der Virusausbreitung eine Rolle spielt. Allerdings können mittlerweile in vielen Ländern hohe Antikörperprävalenzen gegen das CRCoV nachgewiesen werden. Dies spricht für eine schnelle Virusausbreitung. In Italien wiesen 20,0 % (118/590) der Proben von gesunden Hunden im ELISA CRCoV-Antikörper auf (PRIESTNALL et al., 2007). In Neuseeland waren in 29,1 % (73/251) von unselektierten Serumproben CRCoV-Antikörper nachweisbar (KNESL et al., 2009). In Korea konnten bei 12,8 % (62/483) der Serumproben von gesunden Hunden CRCoV-Antikörper detektiert werden (AN et al., 2010b). In weiteren epidemiologischen Studien in den USA, Kanada, England und Irland wurden bei 54,5 % (521/956), 59,1 % (26/44), 36,0 % (299/830) und 30,3 % (20/66) von kaninen Serumproben gesunder Hunde CRCoV-Antikörper nachgewiesen (PRIESTNALL et al., 2006). In Deutschland wurden bisher noch keine Studien zur Antikörperprävalenz in Hundepopulationen durchgeführt.

An und Mitarbeiter (2010a) wiesen in der koreanischen Studie bei allen drei CRCoV-positiven Hunden eine Mischinfektion mit dem CAV-1 und -2, dem caninen Parvovirus 2a oder dem CDV nach. Auch bei den sechs CRCoV-

positiven Hunden in der vorliegenden Studie wurde das Virus gemeinsam mit anderen Pathogenen isoliert. Bei allen Hunden lag eine Mischinfektion mit *B. bronchiseptica* vor, und bei zwei Hunden wurde CPIV als dritter Erreger nachgewiesen. Erles und Mitarbeiter (2003) kamen zu dem Schluss, dass eine CRCoV-Monoinfektion subklinische oder milde Symptome hervorruft, während es in Mischinfektionen mit anderen Erregern durch die Zerstörung des respiratorischen Epithels und die Beeinträchtigung der mukoziliären Clearance schwerere klinische Symptome verursachen kann. Eine CRCoV-Monoinfektion wurde bei den in die vorliegende Studie eingeschlossenen 151 respiratorisch kranken und klinisch gesunden Hunden nicht nachgewiesen, so dass asymptomatische CRCoV-Träger in der hier untersuchten deutschen Hundepopulation keine Rolle zu spielen scheinen.

In der klinischen Untersuchung der sechs CRCoV-positiven Patienten wiesen drei ein mildes Krankheitsbild mit ungestörtem Allgemeinbefinden, Husten, physiologischer Körpertemperatur und unauffälliger Lungenauskultation auf, während die anderen drei schwere klinische Symptome zeigten mit gestörtem Allgemeinbefinden, Husten, mukopurulentem Nasenausfluss, erhöhter Körpertemperatur, vergrößerten *Lymphonodi mandibulares* und veränderten Lungenauskultationsbefunden. Die Aussage von Erles und Mitarbeitern (2003), dass Mischinfektionen mit dem CRCoV mit einem schwereren Krankheitsverlauf assoziiert sind, konnte somit nicht in allen Fällen bestätigt werden. Auch scheint die Anzahl der Pathogene, die an einer Infektion beteiligt sind, keinen Einfluss auf den Schweregrad des Krankheitsbilds zu haben, da die Patienten mit einer CRCoV-Mischinfektion mit zwei weiteren Erregern sowohl milde als auch schwere Symptome zeigten. Vielmehr müssten in diesem Zusammenhang weitere Einflussfaktoren, wie das Alter, weitere immunsupprimierende Krankheiten oder Stresssituationen, untersucht werden. Außerdem können die Virulenz eines Erregers und die aufgenommene Virusmenge den Schweregrad einer Krankheit beeinflussen. Die drei Hunde, die einen schwereren Verlauf der Krankheit zeigten, waren zwischen vier und 15 Monaten alt, während die drei anderen Hunde mit einem milderem Krankheitsverlauf ein Alter zwischen 18 Monaten und neun Jahren aufwiesen. Die Ursache für den schwereren Verlauf der Krankheit könnte in einer unvollständigen Ausreifung des Immunsystems begründet liegen, das eine höhere Anfälligkeit gegenüber Pathogenen aufweist. Auch konnten Erles und



Mitarbeiter (2008) feststellen, dass Hunde, die jünger als ein Jahr alt waren, häufiger CRCoV-Antikörper-negativ waren und im Alter die Antikörper aufgrund zunehmender Hundkontakte ein Plateau erreicht hatten.

Die Symptome, welche bei den sechs Hunden mit einer CRCoV-Infektion auftraten, konnten in dieser Studie nicht mit diesem Erreger in Verbindung gebracht werden, so dass das klinische Bild keinen Hinweis auf das Vorhandensein einer CRCoV-Infektion geben kann. Anamnestische Einflussfaktoren, die eine CRCoV-Infektion begünstigen könnten, wurden ebenfalls nicht ermittelt. Auch konnten keine gastrointestinalen Symptome im Zusammenhang mit einer CRCoV-Infektion beobachtet werden, obwohl das Virus neben respiratorischen Symptomen auch gastrointestinale Beschwerden verursachen kann (MITCHELL et al., 2009).

Auch das CHV wurde aus dem Respirationstrakt von Hunden mit Atemwegsinfektionen ohne Beteiligung weiterer respiratorischer Erreger isoliert und wird als potenzieller Primärerreger für kanine Atemwegsinfektionen diskutiert (KAWAKAMI et al., 2010). In der vorliegenden Studie war der Nachweis des CHV bei allen 151 Studienpatienten negativ, so dass derzeit kein Hinweis auf eine Beteiligung des CHV bei akuten Atemwegsinfektionen in der deutschen Hundepopulation besteht. Die Entwicklung einer CHV-assoziierten Symptomatik ist vom Alter abhängig (GREENE & CARMICHAEL, 2006). Die Infektion führt bei neugeborenen Hundewelpen rasch zum Tod (DECARO et al., 2008), während sie bei Hunden, die älter als zwei Wochen sind, keine oder sehr milde respiratorische Symptome auslöst (THOMPSON et al., 1972). Für eine Infektion muss ein direkter Kontakt zu infizierten Hunden gewährleistet sein, da das Virus in der Umwelt rasch inaktiviert wird (CARMICHAEL & GREENE, 1998). Alle in die Studie eingeschlossenen Hunde waren älter als drei Monate. In Deutschland wurden CHV-Antikörper bei 39,1 % (50/128) der Zuchthunde, bei 12,0 % (15/125) domestizierten adulten Hunden, bei 18,8 % (313/1666) der Hunde in Zwingerhaltungen und bei 8,1 % (5/62) der Welpen nachgewiesen (BIBRACK & SCHAUDINN, 1976; KÖNIG et al., 2004). Prävalenzstudien in England, Holland und Belgien erbrachten eine CHV-Antikörper-Prävalenz von 76,0 ó 88,0 % von 325 (READING & FIELD, 1998), 39,3 % von 88 (RIJSEWIJK et al., 1999) und 45,8 % von 647 Serumproben von klinisch gesunden Hunden (RONSSE et al., 2002). Hunde können latent mit dem CHV infiziert sein. Das

Virus persistiert dann im Trigeminusganglion, Lumbosakralganglion, in den Tonsillen und der Parotis (CARMICHAEL & GREENE, 1998) und kann mittels PCR nicht nachgewiesen werden. Diese Hunde haben aber Antikörper. Dies erklärt die höheren Prävalenzen in den Studien, in denen Antikörper nachgewiesen wurden.

In einer Studie in Japan entwickelten 15 Hunde während eines Klinikaufenthaltes respiratorische Symptome, die mit einer nachgewiesenen CHV-Infektion in Verbindung gebracht werden konnten (KAWAKAMI et al., 2010). Somit scheinen für eine CHV-Infektion vor allem Hunde anfällig zu sein, die ein geschwächtes Immunsystem besitzen, sich in einer Stresssituation befinden oder aufgrund einer anderen Grunderkrankung eine Reaktivierung eines latent vorliegenden Virus mit Ausbildung respiratorischer Symptome erfahren.

Die Beteiligung des CDV am CIRD-Komplex scheint geographisch unterschiedlich zu sein und von den Einschlusskriterien der untersuchten Population abzuhängen, da das CDV neben respiratorischen Symptomen auch gastrointestinale und neurologische Symptome auslösen kann. So konnte das Virus in einer Studie in Japan bei ausschließlich respiratorisch kranken Hunden nur bei 1,5 % (1/68) der Hunde mittels RT-PCR aus Konjunktival- und Rachentupfern gefunden werden (MOCHIZUKI et al., 2008), während das CDV in Ungarn bei 30,7 % (46/150) der Hunde mit Staupeverdacht und entsprechenden gastrointestinalen, respiratorischen und neurologischen Symptomen aus Urin-, Blut- oder Nasentupferproben nachgewiesen werden konnte (DEMETER et al., 2007). In der vorliegenden Studie wurde weder bei Hunden mit respiratorischen Symptomen, noch bei gesunden Hunden CDV aus Nasen- und Rachentupfern gefunden. Die meisten Hunde, die an einer Staupeinfektion erkranken, sind in einem Alter zwischen drei und sechs Monaten, da jüngere Hunde meist durch maternale Antikörper passiv und die meisten älteren Hunde durch eine Impfung geschützt sind (MARTELLA et al., 2008). In der vorliegenden Studie waren neun der respiratorisch kranken Hunde in dieser Altersspanne. Alle hatten aber zum Zeitpunkt des Klinikbesuchs die ersten beiden Impfungen der Grundimmunisierung erhalten, so dass sie dadurch vermutlich bereits einen gewissen Schutz hatten. Ob unter den hier untersuchten respiratorisch kranken und gesunden Hunden ein persistent infiziertes, aber PCR-negatives Tier vorlag, kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Jedoch scheint das CDV als

Verursacher respiratorischer Infektionen in Deutschland an Bedeutung verloren zu haben. Dies kann auf einen guten Schutz durch die Impfung zurückgeführt werden.

Neben respiratorischen Symptomen verursacht CDV auch gastrointestinale und neurologische Symptome. Hunde mit solchen Symptomen wurden in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigt, während Demeter und Mitarbeiter (2007) in einer Studie in Ungarn auch Hunde mit gastrointestinalen und neurologischen Symptomen auf CDV untersuchten. Die hohe Anzahl an CDV-positiv getesteten Hunden kann somit in den unterschiedlichen Einschlusskriterien für Studienteilnehmer begründet liegen. Außerdem ist davon auszugehen, dass in Deutschland ein besserer Schutz der Hundepopulation durch Impfung gegeben ist als in Ungarn.

In der vorliegenden Studie erfolgte die Isolierung des CDV aus Nasen- und Rachentupfern. Allerdings stellt der Nachweis des CDV aus Konjunktivaltupfern die sensitivere Methode dar. Dies bewies eine Studie von Kim und Mitarbeitern (2006). Idealerweise hätte die vorliegende Studie für den Nachweis des CDV neben Nasen- und Rachentupfern auch Konjunktivaltupfer einschließen müssen, um falsch-negative Ergebnisse auszuschließen.

Da wildlebende Tiere für das CDV als Erregerreservoir dienen (APPEL & SUMMERS, 1995) und das Hämagglutininprotein des CDV eine genetische Dynamik aufweist und somit die Möglichkeit besitzt, neue Virusstämme zu bilden (MARTELLA et al., 2008), darf das Virus auch zum jetzigen Zeitpunkt in der deutschen Hundepopulation nicht unterschätzt werden. Es sollte differentialdiagnostisch vor allem bei ungeimpften Hunden mit respiratorischen, gastrointestinalen und neurologischen Symptomen in Betracht gezogen werden.

In der vorliegenden Studie konnte *B. bronchiseptica* bei 78,8 % (48/61) der Hunde mit akuten respiratorischen Symptomen und bei 45,6 % (41/90) der klinisch gesunden Hunde nachgewiesen werden. Für diesen Erreger konnte ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Nachweishäufigkeit zwischen gesunden und kranken Hunden festgestellt werden. Das bedeutet, dass Hunde mit respiratorischen Symptomen signifikant häufiger mit *B. bronchiseptica* infiziert waren. Damit kommt dem Bakterium eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von akuten respiratorischen Infektionen beim Hund zu. Außerdem

wiesen 52,1 % (25/48) der respiratorisch kranken Hunde mit einer *B. bronchiseptica*-Infektion eine Monoinfektion mit diesem Erreger auf. Somit kann die Aussage bestätigt werden, dass das Bakterium ohne Beteiligung viraler Erreger in der Lage ist, respiratorische Symptome auszulösen (THOMPSON et al., 1976). Der Erregernachweis bei gesunden Hunden ermittelte mit 45,6 % aber auch eine große Anzahl an asymptomatischen Trägern des Bakteriums. Diese positiv getesteten Hunde ohne respiratorische Auffälligkeiten stellen eine potenzielle Infektionsquelle für empfängliche Individuen dar. Chalker und Mitarbeiter (2003a) konnten ebenfalls asymptomatische Träger von *B. bronchiseptica* identifizieren. Insgesamt wurden in ihrer Studie in Großbritannien 156 BALF-Proben von Hunden mit und ohne respiratorische Symptome kulturell auf *B. bronchiseptica* untersucht. Dabei wurde der Erreger auch bei 54 gesunden Hunden nachgewiesen (CHALKER et al., 2003a). Da Infektionen mit *B. bronchiseptica* asymptomatisch verlaufen können, und es nach einer Infektion zu einer langen Ausscheidungsphase von bis zu drei Monaten nach Genesung kommen kann (APPEL & BINN, 1987b), gestaltet sich eine komplette Erregerelimination aus der Hundepopulation als schwierig.

Kürzlich wurde in Deutschland eine retrospektive Studie zur Beurteilung des aktuellen Bakterienvorkommens bei Hunden mit respiratorischen Krankheiten durchgeführt. Die BALF-Proben von respiratorisch kranken Hunden wurden darin kulturell auf das Vorhandensein von *B. bronchiseptica* untersucht. Hierbei konnte das Bakterium in 20,2 % (20/99) der Proben nachgewiesen werden (STEINFELD et al., 2012). Vergleicht man diesen Wert mit dem Ergebnis der vorliegenden Studie, in der *B. bronchiseptica* bei 78,8 % der Hunde mit akuten respiratorischen Symptomen nachweisbar war, so ist zu berücksichtigen, dass der Nachweis mittels PCR im Vergleich zur Bakterienisolierung eine sensitivere Methode darstellt (REIZENSTEIN et al., 1993). Außerdem wurden in die Studie von Steinfeld und Mitarbeitern (2012) unselektiert Hunde mit akuten und chronischen Atemwegserkrankungen eingeschlossen, so dass auch Hunde mit nicht infektiösen Atemwegsproblemen in die Studie eingingen.

In einer retrospektiven Studie aus den USA wurden 264 kanine Trachealspülproben von Hunden mit respiratorischen Symptomen kulturell auf *B. bronchiseptica* untersucht. In dieser Untersuchung war der Erreger nur bei 12,1 % (32/264) der respiratorisch auffälligen Hunde nachweisbar (ANGUS et al.,

1997). Die Entnahmetechnik sowie die Gewinnung einer BALF zur Untersuchung auf *B. bronchiseptica* stellt im Vergleich zur Rachentupferprobe eine sterilere Methode dar (SUMNER et al., 2011). Möglicherweise kann das häufige Vorkommen an *B. bronchiseptica* in der vorliegenden Studie im Vergleich zu den Studien von Steinfeld und Mitarbeitern (2012) und Angus und Mitarbeitern (1997), in denen der Bakteriennachweis aus den tieferen Atemwegen erfolgte, auch durch geringe Mengen an Bakterien erklärt werden, die physiologisch als Schleimhautkommensalen im Nasopharynx vorhanden sind (YUK et al., 2000). Der Verlauf und der Schweregrad einer *B.-bronchiseptica*-Infektion hängen somit wahrscheinlich von der Bakterienmenge, von Umweltfaktoren und der Funktionalität der lokalen Abwehrmechanismen des Respirationstrakts ab. Ein *B.-bronchiseptica*-Nachweis aus dem oberen Atmungstrakt sollte daher immer im Zusammenhang mit dem klinischen Bild interpretiert werden.

In einer vergleichbaren Studie aus Japan konnte *B. bronchiseptica* mittels PCR bei 10,3 % (7/68) von respiratorisch kranken Hunden aus Nasen- und Rachentupfern nachgewiesen werden (MOCHIZUKI et al., 2008). Die Prävalenz von *B. bronchiseptica* scheint somit in Japan im Vergleich zu Deutschland bei gleicher Probenentnahmetechnik und Nachweis mittels PCR niedriger zu sein, was für regionale Unterschiede spricht.

Ein Zusammenhang zwischen anamnestischen und labordiagnostischen Faktoren mit einer *B.-bronchiseptica*-Infektion konnte in der vorliegenden Studie nicht hergestellt werden. Das mittlere Alter der untersuchten Hunde mit einer *B.-bronchiseptica*-Infektion lag bei 3,9 Jahren. Dies widerlegt die Aussage, dass eine Infektion mit diesem Erreger vor allem bei Welpen nach dem Absetzen vom Muttertier auftritt (BEMIS et al., 1977c). Neben Hunden konnte das Bakterium auch bei Katzen (FISK & SOAVE, 1973) und Schweinen (GANAWAY et al., 1965) nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang zwischen einer Infektion mit *B. bronchiseptica* und dem Kontakt zu Katzen oder Schweinen, die eine mögliche Infektionsquelle für den Hund darstellen können, konnte in der vorliegenden Studie nicht hergestellt werden. Über die Wirksamkeit einer Impfung gegen *B. bronchiseptica* kann im Rahmen der Studie keine Aussage getroffen werden, da lediglich ein gesunder Hund eine intranasale Impfung gegen das Bakterium erhalten hatte.

Charakteristische Symptome, wie ein trockener, krampfartiger Husten, der bei Bewegung und Aufregung an Intensität zunimmt (SHELTON et al., 1977), konnten in der vorliegenden Studie in der klinischen Untersuchung nicht signifikant im Zusammenhang mit einer *B.-bronchiseptica*-Infektion gebracht werden.

In der vorliegenden Studie wurde keine Leukozytose mit Erhöhung der stabkernigen neutrophilen Granulozyten und keine Monozytose bei Hunden mit *B.-bronchiseptica*-Infektion nachgewiesen, wie man es bei bakteriellen Infektionen im Gegensatz zu Virusinfektionen erwarten könnte (ELLIS et al., 2001). Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die lokale Immunabwehr im Respirationstrakt meist zur Bekämpfung von *B. bronchiseptica* ausreicht und keine systemische Ausbreitung des Erregers stattfindet (KING, 1998).

Die meisten respiratorisch auffälligen Hunde wurden in dieser Studie im Sommer ( $27/61 = 44,3 \%$ ) oder im Herbst ( $19/61 = 31,1 \%$ ) vorgestellt. Insgesamt wurden  $59,3 \%$  ( $16/27$ ) der Hunde, die im Sommer respiratorische Symptome entwickelten, im Tierheim gehalten. Diese Häufung von Tierheimtieren beeinflusste möglicherweise die Verteilung der Patienten über das Jahr. Wurden nur die symptomatischen Hunde aus Privathaushalten betrachtet, so konnte die höchste Anzahl an Atemwegsinfektionen im Herbst registriert werden. Es wird diskutiert, dass niedrige Außentemperaturen, ähnlich wie bei der Entstehung von humanen Erkältungskrankheiten, möglicherweise eine Infektion des Respirationstrakts begünstigen. Hierbei wird angenommen, dass kühlere Temperaturen die Immunabwehr der Schleimhautoberfläche des oberen Respirationstrakts negativ beeinflussen und dadurch der Eintritt von Erregern erleichtert wird (ECCLES, 2002).

In der vorliegenden Studie wurden von allen untersuchten Erregern *B. bronchiseptica* und das CPIV als Haupterreger bei der Entstehung von akuten respiratorischen Infektionen des Hundes identifiziert. Dabei traten die Infektionen bei den meisten Patienten mit milden klinischen Symptomen auf. Bei  $72,2 \%$  ( $44/61$ ) der respiratorisch symptomatischen Hunde wurde ein gleichbleibender Krankheitsverlauf oder sogar eine Verbesserung der Symptome seit Beginn der Krankheit bis zum Tag der Vorstellung beobachtet. Dies deckt sich mit der

Beobachtung von Appel und Mitarbeitern (1987a), welche beschrieben, dass akute respiratorische Infektionen beim Hund meist einen milden, selbstlimitierenden Krankheitsverlauf aufweisen.

In der Studie sind einige limitierende Faktoren zu berücksichtigen, die die Interpretation der Ergebnisse beeinflussen. Im standardisierten Anamnesebogen wurden keine Informationen zur Gabe von Antibiotika innerhalb der letzten Wochen vor Ausbruch der respiratorischen Symptomatik erhoben, so dass der Nachweis von *B. bronchiseptica* in manchen Fällen vielleicht nicht mehr möglich war und einige Träger des Bakteriums nicht erkannt wurden. Schließlich unterliegen vom Besitzer ausgefüllte Anamnesebögen immer einer gewissen Subjektivität, die nur eine bedingte Auswertung anamnestischer Parameter ermöglicht.

Der Erregernachweis erfolgte ausschließlich durch eine Probenentnahme aus dem oberen Respirationstrakt. Die Entnahme einer Trachealspülprobe oder einer BALF-Probe war im Rahmen der Studie nicht vorgesehen, da diese Art der invasiveren Probenentnahme eine Narkose der Tiere erfordert hätte. Somit konnte die Bedeutung respiratorischer Erreger im unteren Respirationstrakt nicht berücksichtigt werden und die nachgewiesenen Erreger spiegeln ausschließlich respiratorischen Infektionen des oberen Atmungstrakts wieder.

Durch einen quantitativen Erregernachweis wäre möglicherweise eine Differenzierung zwischen krankheitsinduzierenden Erregern und physiologischen Schleimhautkommensalen möglich gewesen. In der vorliegenden Studie wurde eine solche Unterscheidung nicht vorgenommen, so dass keine Aussagen über einen quantitativen Erregervergleich zwischen Patienten- und Kontrollgruppe getroffen werden konnten.

Eine Verlaufsuntersuchung wurde in der vorliegenden Studie ebenfalls nicht durchgeführt, so dass die Beurteilung des Schweregrades einer respiratorischen Symptomatik ausschließlich durch eine einzige Untersuchung erfolgte und auch potenziell zu einem späteren Zeitpunkt auftretende respiratorische Symptome bei Hunden der Kontrollgruppe somit nicht registriert werden konnten.

In der vorliegenden Studie wurden *B. bronchiseptica* und CPIV als wichtigste Auslöser von akuten respiratorischen Infektionen beim Hund ermittelt. Die Ergebnisse zeigten weiterhin, dass auch dem CRCoV eine Rolle im CIRD-

---

Komplex in der deutschen Hundepopulation zuzuschreiben ist. Neben Hunden mit klinisch manifesten Infektionen konnten auch asymptomatische Träger von *B. bronchiseptica* und CPIV nachgewiesen werden, denen eine entscheidende Bedeutung als Infektionsquelle für andere Hunde zukommt.



## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Verschiedene virale Erreger und Bakterien können bei der Entstehung von akuten respiratorischen Infektionen des Hundes beteiligt sein (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007). So wurden das canine Parainfluenzavirus (CPIV), das canine Adenovirus Typ 2 (CAV-2), das canine Influenzavirus (CIV), das canine respiratorische Coronavirus (CRCoV), das canine Herpesvirus (CHV), das canine Staupevirus (CDV) und *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*) bei Hunden mit Atemwegsinfektionen nachgewiesen (APPEL & PERCY, 1970; WRIGHT et al., 1974; BEMIS et al., 1977c; ERLES et al., 2003; CRAWFORD et al., 2005; KAWAKAMI et al., 2010). Ziel der Studie war es, die Bedeutung dieser Erreger bei akuten respiratorischen Infektionen des Hundes zu untersuchen.

Im Rahmen der Studie wurden bei 61 Hunden mit respiratorischen Symptomen und bei 90 klinisch gesunden Hunden Rachen- und Nasentupferproben entnommen und mittels PCR auf CPIV, CAV-2, CIV, CRCoV, CHV, CDV und *B. bronchiseptica* untersucht. Außerdem wurde geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen anamnestischen, klinischen und labordiagnostischen Parametern und dem Nachweis eines bestimmten Erregers bestand.

In der Gruppe der respiratorisch kranken Hunde wurde bei 37,7 % (23/61) das CPIV und bei 78,8 % (48/61) *B. bronchiseptica* nachgewiesen. Bei 52,1 % (25/48) der *B.-bronchiseptica*-positiven und bei 17,4 % (4/23) der CPIV-positiven Hunde lagen Monoinfektionen vor; die übrigen Tiere zeigten Mischinfektionen mit anderen Erregern. Bei 9,8 % (6/61) der respiratorisch auffälligen Hunde wurde CRCoV nachgewiesen. Dieses Virus trat bei allen CRCoV-positiven Hunden als Mischinfektion mit *B. bronchiseptica* auf.

Bei 7,8 % (7/90) der klinisch gesunden Hunde wurde das CPIV und bei 45,6 % (41/90) *B. bronchiseptica* nachgewiesen. CPIV und *B. bronchiseptica* wurden signifikant häufiger bei Hunden mit Atemwegssymptomen nachgewiesen als bei gesunden Hunden. CAV-2 konnte bei einem Hund aus der gesunden Kontrollgruppe detektiert werden; CIV, CHV und CDV wurden bei keinem Studienteilnehmer nachgewiesen.

Anamnestische Faktoren, klinische Auffälligkeiten sowie labordiagnostische Veränderungen konnten nicht in Zusammenhang mit einem bestimmten Erreger

---

gebracht werden.

Wie bereits in Studien in anderen Ländern gezeigt wurde, stellen CPIV und *B. bronchiseptica* in der vorliegenden Studie die Haupterreger von respiratorischen Infektionen beim Hund dar. Auch gesunde Hunde können Träger der beiden Erreger sein und stellen so eine potenzielle Infektionsquelle für empfängliche Hunde dar.

## VII. SUMMARY

Various viral and bacterial agents are involved in the etiology of acute respiratory tract infections in dogs (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007). In dogs with acute respiratory tract infections detected pathogens included canine parainfluenza virus (CPIV), canine adenovirus type 2 (CAV-2), canine influenza virus (CIV), canine respiratory coronavirus (CRCoV), canine herpes virus (CHV), canine distemper virus (CDV), and *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*) (APPEL & PERCY, 1970; WRIGHT et al., 1974; BEMIS et al., 1977c; ERLES et al., 2003; CRAWFORD et al., 2005; KAWAKAMI et al., 2010). Purpose of the study was to investigate the importance of potential pathogenic agents in acute canine respiratory tract infections.

Nasal and pharyngeal swabs were collected from 61 dogs with acute respiratory signs and from 90 clinically healthy dogs. These swabs were analyzed for the presence of CPIV, CAV-2, CIV, CRCoV, CHV, CDV and *B. bronchiseptica* by PCR. Furthermore, anamnestic factors and clinical and laboratory parameters were evaluated for a correlation with one of the isolated pathogens.

In dogs with acute respiratory signs, 37.7% (23/61) tested positive for CPIV, and 78.8% (48/61) tested positive for *B. bronchiseptica*. Of dogs infected with *B. bronchiseptica*, 52.1 % (25/48) had mono-infections with this bacterium, while 17.4% (4/23) of dogs infected with CPIV were only infected with this virus. In all remaining cases, *B.-bronchiseptica* and CPIV-infected dogs showed co-infections with another pathogen. In 9.8% (6/61) of dogs with acute respiratory signs CRCoV was detected. All dogs infected with CRCoV had co-infections with *B. bronchiseptica*.

In clinically healthy dogs, 7.8% (7/90) tested positive for CPIV and 45.6% (41/90) tested positive for *B. bronchiseptica*. CPIV and *B. bronchiseptica* were detected significantly more often in dogs with acute respiratory disease than in clinically healthy dogs. In one clinically healthy dog, CAV-2 was isolated. CIV, CHV, and CDV could not be detected in any of the study's participants.

Anamnestic factors, clinical signs and laboratory findings were not be associated with any of the isolated pathogenic agents.

---

This study confirms data shown in studies from other countries before. CPIV and *B. bronchiseptica* represent the most common agents in dogs with acute respiratory infections. However, clinically healthy dogs can also be asymptomatic carriers of these two pathogens, and therefore, act as a source of infection for susceptible dogs.

**VIII. LITERATURVERZEICHNIS**

Adams JM, Brown WJ, Snow HD, Lincoln SD, Sears AW, Jr., Barenfus M, Holliday TA, Cremer NE, Lennette EH. Old dog encephalitis and demyelinating diseases in man. *Vet Pathol* 1975; 12: 220-6.

Ajiki M, Takamura K, Hiramatsu K, Nakai M, Sasaki N, Konishi S. Isolation and characterization of parainfluenza 5 virus from a dog. *Nihon Juigaku Zasshi* 1982; 44: 607-18.

Alekseev KP, Vlasova AN, Jung K, Hasoksuz M, Zhang X, Halpin R, Wang S, Ghedin E, Spiro D, Saif LJ. Bovine-like coronaviruses isolated from four species of captive wild ruminants are homologous to bovine coronaviruses, based on complete genomic sequences. *J Virol* 2008; 82: 12422-31.

An DJ, Jeong W, Yoon SH, Jeoung HY, Kim HJ, Park BK. Genetic analysis of canine group 2 coronavirus in Korean dogs. *Vet Microbiol* 2010a; 141: 46-52.

An DJ, Jeoung HY, Jeong W, Chae S, Song DS, Oh JS, Park BK. A serological survey of canine respiratory coronavirus and canine influenza virus in Korean dogs. *J Vet Med Sci* 2010b; 72: 1217-9.

Anderson TC, Bromfield CR, Crawford PC, Dodds WJ, Gibbs EP, Hernandez JA. Serological evidence of H3N8 canine influenza-like virus circulation in USA dogs prior to 2004. *Vet J* 2012; 191: 312-6.

Andrejeva J, Young DF, Goodbourn S, Randall RE. Degradation of STAT1 and STAT2 by the V proteins of simian virus 5 and human parainfluenza virus type 2, respectively: consequences for virus replication in the presence of alpha/beta and gamma interferons. *J Virol* 2002; 76: 2159-67.

Angus JC, Jang SS, Hirsh DC. Microbiological study of transtracheal aspirates from dogs with suspected lower respiratory tract disease: 264 cases. *J Am Vet Med Assoc* 1997; 210: 55-8.

Appel MJ. Pathogenesis of canine distemper. *Am J Vet Res* 1969; 30: 1167-82.

Appel MJ, Menegus M, Parsonson IM, Carmichael LE. Pathogenesis of canine herpesvirus in specific-pathogen-free dogs: 5- to 12-week-old pups. *Am J Vet Res* 1969; 30: 2067-73.

Appel MJ. Canine infectious tracheobronchitis (kennel cough): a status report. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1981; 70-9.

Appel MJ, Percy DH. SV5-like parainfluenza virus in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1970; 156: 1778-81.

Appel MJ, Bistner SI, Menegus M, Albert DA, Carmichael LE. Pathogenicity of low-virulence strains of two canine adenovirus types. *Am J Vet Res* 1973; 34: 543-50.

Appel MJ. Reovirus. In: Appel MJ, editor. *Virus Infections of Carnivores*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1987a, p. 95-6.

Appel MJ. Canine adenovirus type 2 (Infectious Laryngotracheitis Virus). In: Appel MJ, editor. *Virus Infections of Carnivores*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1987b, p: 45-51.

Appel MJ. Canine distemper virus. In: Appel MJ, editor. *Virus Infections of Carnivores*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1987c, p: 133-59.

Appel MJ, Binn LN. Canine infectious tracheobronchitis. In: Appel MJ, editor. *Virus Infections of Carnivores*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1987a, p. 201-11.

Appel MJ, Binn LN. Canine Parainfluenzavirus. In: Appel MJ, editor. *Virus Infections of Carnivores*. Amsterdam: Elsevier Science Publisher, 1987b, p: 125-32.

Appel MJ, Summers BA. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Vet Microbiol* 1995; 44: 187-91.

Axthelm MK, Krakowka S. Experimental old dog encephalitis (ODE) in a gnotobiotic dog. *Vet Pathol* 1998; 35: 527-34.

Bartsch RC, Hubschle OJ, Els HJ. Canine herpesvirus infection: literature review and case report. *J S Afr Vet Assoc* 1974; 45: 81-5.

Batey RG, Smits AF. The isolation of *Bordetella bronchiseptica* from an outbreak of canine pneumonia. *Aust Vet J* 1976; 52: 184-6.

Bemis DA, Greisen HA, Appel MJ. Pathogenesis of canine bordetellosis. *J Infect Dis* 1977a; 135: 753-62.

Bemis DA, Greisen HA, Appel MJ. Bacteriological variation among *Bordetella*

*bronchiseptica* isolates from dogs and other species. J Clin Microbiol 1977b; 5: 471-80.

Bemis DA, Carmichael LE, Appel MJ. Naturally occurring respiratory disease in a kennel caused by *Bordetella bronchiseptica*. Cornell Vet 1977c; 67: 282-93.

Bemis DA, Kennedy JR. An improved system for studying the effect of *Bordetella bronchiseptica* on the ciliary activity of canine tracheal epithelial cells. J Infect Dis 1981; 144: 349-57.

Benetka V, Weissenböck H, Kudielka I, Pallan C, Rothmüller G, Mostl K. Canine adenovirus type 2 infection in four puppies with neurological signs. Vet Rec 2006; 158: 91-4.

Bibrack B, Schaudinn W. [Occurrence of herpes infections in dogs in the Federal Republic of Germany with a rapid neutralization test]. Zentralbl Veterinärmed B 1976; 23: 384-90.

Binn LN, Eddy GA, Lazar EC, Helms J, Murnane T. Viruses recovered from laboratory dogs with respiratory disease. Proc Soc Exp Biol Med 1967; 126: 140-5.

Binn LN, Koughan WP, Lazar E. A simple plaque procedure for comparing antigenic relationships of canine herpesvirus. J Am Vet Med Assoc 1970a; 156: 1724-5.

Binn LN, Lazar EC, Helms J, Cross RE. Viral antibody patterns in laboratory dogs with respiratory disease. Am J Vet Res 1970b; 31: 697-702.

Binn LN, Marchwicki RH, Keenan KP, Strano AJ, Engler WF. Recovery of reovirus type 2 from an immature dog with respiratory tract disease. Am J Vet Res 1977; 38: 927-9.

Binn LN, Alford JP, Marchwicki RH, Keefe TJ, Beattie RJ, Wall HG. Studies of respiratory disease in random-source laboratory dogs: viral infections in unconditioned dogs. Lab Anim Sci 1979; 29: 48-52.

Biron C, Sen G. Interferons and other cytokines. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editor. Fields virology, 4 edn. Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001, p: 321-49.

Bittle JL, Emery JB. The epizootiology of canine parainfluenza. J Am Vet Med

Assoc 1970; 156: 1771-3.

Black LS, Lee KM. Infection of dogs and cats with a canine parainfluenza virus and the application of a conglutinating-complement-absorption test on cat serums. Cornell Vet 1970; 60: 120-34.

Bujko M, Sulovic V, Zivanovic V, Lako B, Dotlic R. Effect of progesterone and pregnancy on the replication of herpes simplex virus type 2 in vivo. Clin Exp Obstet Gynecol 1988; 15: 34-7.

Buonavoglia C, Sala V. Indagine sierologica nei cani sulla presenza di anticorpi verso ceppi di virus influenzali umani tipo A. Clin Vet 1983; 106: 81-3.

Buonavoglia C, Martella V. Canine respiratory viruses. Vet Res 2007; 38: 355-73.

Burek KA, Gulland FM, Sheffield G, Beckmen KB, Keyes E, Spraker TR, Smith AW, Skilling DE, Evermann JF, Stott JL, Saliki JT, Trites AW. Infectious disease and the decline of Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*) in Alaska, USA: insights from serologic data. J Wildl Dis 2005; 41: 512-24.

Burr PD, Campbell ME, Nicolson L, Onions DE. Detection of canine herpesvirus 1 in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction. Vet Microbiol 1996; 53: 227-37.

Byun JW, Yoon SS, Woo GH, Jung BY, Joo YS. An outbreak of fatal hemorrhagic pneumonia caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* in shelter dogs. J Vet Sci 2009; 10: 269-71.

Carmichael LE, Squire RA, Krook L. Clinical and pathologic features of a fatal viral disease of newborn pups. Am J Vet Res 1965a; 26: 803-14.

Carmichael LE, Strandberg JD, Barnes FD. Identification of a cytopathogenic agent infectious for puppies as a canine herpesvirus. Proc Soc Exp Biol Med 1965b; 120: 644-50.

Carmichael LE, Barnes FD, Percy DH. Temperature as a factor in resistance of young puppies to canine herpesvirus. J Infect Dis 1969; 120: 669-78.

Carmichael LE. Herpesvirus canis: aspects of pathogenesis and immune response. J Am Vet Med Assoc 1970; 156: 1714-21.

Carmichael LE, Greene CE. Canine herpesvirus infection. In: Greene CE, editor. Infectious Diseases of the Dog and Cat, Philadelphia: WB Saunders Co, 1998, p:



28-32.

Castleman WL. Bronchiolitis obliterans and pneumonia induced in young dogs by experimental adenovirus infection. *Am J Pathol* 1985; 119: 495-504.

Castleman WL, Powe JR, Crawford PC, Gibbs EP, Dubovi EJ, Donis RO, Hanshaw D. Canine H3N8 influenza virus infection in dogs and mice. *Vet Pathol* 2010; 47: 507-17.

Chalker VJ, Toomey C, Opperman S, Brooks HW, Ibuoye MA, Brownlie J, Rycroft AN. Respiratory disease in kennelled dogs: serological responses to *Bordetella bronchiseptica* lipopolysaccharide do not correlate with bacterial isolation or clinical respiratory symptoms. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003a; 10: 352-6.

Chalker VJ, Brooks HW, Brownlie J. The association of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* with canine infectious respiratory disease. *Vet Microbiol* 2003b; 95: 149-56.

Chalker VJ, Owen WM, Paterson C, Barker E, Brooks H, Rycroft AN, Brownlie J. Mycoplasmas associated with canine infectious respiratory disease. *Microbiology* 2004; 150: 3491-7.

Chalker VJ. Canine mycoplasmas. *Res Vet Sci* 2005; 79: 1-8.

Chang PW, Hsiung GD. Experimental infection of parainfluenza virus type 5 in mice, hamsters and monkeys. *J Immunol* 1965; 95: 591-601.

Cheung CY, Poon LL, Lau AS, Luk W, Lau YL, Shortridge KF, Gordon S, Guan Y, Peiris JS. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease. *Lancet* 2002; 360: 1831-7.

Chladek DW, Williams JM, Gerber DL, Harris LL, Murdock FM. Canine parainfluenza-*Bordetella bronchiseptica* vaccine immunogenicity. *Am J Vet Res* 1981; 42: 266-70.

Chvala S, Benetka V, Mostl K, Zeugswetter F, Spargser J, Weissenböck H. Simultaneous canine distemper virus, canine adenovirus type 2, and *Mycoplasma cynos* infection in a dog with pneumonia. *Vet Pathol* 2007; 44: 508-12.

Coote JG. Environmental sensing mechanisms in *Bordetella*. *Adv Microb Physiol*

2001; 44: 141-81.

Cordy DR. Canine encephalomyelitis. Cornell Vet 1942; 11-28.

Cornwell HJ, Wright NG, Campbell RS, Roberts RJ. Neonatal disease in the dog associated with a herpes-like virus. Vet Rec 1966; 79: 661-2.

Cotter PA, Yuk MH, Mattoo S, Akerley BJ, Boschwitz J, Relman DA, Miller JF. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* is required for efficient establishment of tracheal colonization. Infect Immun 1998; 66: 5921-9.

Cowdry EV. A comparison of the intranuclear inclusions produced by the herpetic virus and by virus III in rabbits. Arch Pathol 1930; 10: 23-37.

Crandell RA, Brumlow WB, Davison VE. Isolation of a parainfluenza virus from sentry dogs with upper respiratory disease. Am J Vet Res 1968; 29: 2141-7.

Crawford PC, Dubovi EJ, Castleman WL, Stephenson I, Gibbs EP, Chen L, Smith C, Hill RC, Ferro P, Pompey J, Bright RA, Medina MJ, Johnson CM, Olsen CW, Cox NJ, Klimov AI, Katz JM, Donis RO. Transmission of equine influenza virus to dogs. Science 2005; 310: 482-5.

Crawford PC. Canine influenza: Epidemiology, clinical disease, diagnosis, treatment, and prevention. College of Veterinary Medicine, University of Florida, 2009, <http://www.iscaid.org/>.

Crispe E, Finlaison D, Hurt A, Kirkland P. Infection of dogs with equine influenza virus: evidence for transmission from horses during the Australian outbreak. Aust Vet J 2011; 89 Suppl 1: 27-8.

Curtis R, Jemmett JE, Furminger IG. The pathogenicity of an attenuated strain of canine adenovirus type 2 (CAV-2). Vet Rec 1978; 103: 380-1.

Daly JM, Blunden AS, Macrae S, Miller J, Bowman SJ, Kolodziejek J, Nowotny N, Smith KC. Transmission of equine influenza virus to English foxhounds. Emerg Infect Dis 2008; 14: 461-4.

Damian M, Morales E, Salas G, Trigo FJ. Immunohistochemical detection of antigens of distemper, adenovirus and parainfluenza viruses in domestic dogs with pneumonia. J Comp Pathol 2005; 133: 289-93.

Davison AJ, Benko M, Harrach B. Genetic content and evolution of adenoviruses. J Gen Virol 2003; 84: 2895-908.

De Benedictis P, Anderson TC, Perez A, Viale E, Veggiato C, Tiozzo Caenazzo S, Crawford PC, Capua I. A diagnostic algorithm for detection of antibodies to influenza A viruses in dogs in Italy (2006-2008). *J Vet Diagn Invest* 2010; 22: 914-20.

De Ratuld Y, Werner GH. [Isolation of an infectious agent of viral nature from in vitro cultures of renal cells of dogs. Biological characteristics and pathogenicity for dogs]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 1965; 261: 5725-8.

De Ratuld Y, Werner GH. [Study of the relations between the tumorigenic virus of quail and Rous sarcoma virus]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1968; 115: 122-8.

Decaro N, Camero M, Greco G, Zizzo N, Tinelli A, Campolo M, Pratelli A, Buonavoglia C. Canine distemper and related diseases: report of a severe outbreak in a kennel. *New Microbiol* 2004; 27: 177-81.

Decaro N, Desario C, Elia G, Mari V, Lucente MS, Cordioli P, Colaianni ML, Martella V, Buonavoglia C. Serological and molecular evidence that canine respiratory coronavirus is circulating in Italy. *Vet Microbiol* 2007; 121: 225-30.

Decaro N, Martella V, Buonavoglia C. Canine adenoviruses and herpesvirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2008; 38: 799-814.

Decaro N, Amorisco F, Desario C, Lorusso E, Camero M, Bellacicco AL, Sciarretta R, Lucente MS, Martella V, Buonavoglia C. Development and validation of a real-time PCR assay for specific and sensitive detection of canid herpesvirus 1. *J Virol Methods* 2010; 169: 176-80.

Demeter Z, Lakatos B, Palade EA, Kozma T, Forgach P, Rusvai M. Genetic diversity of Hungarian canine distemper virus strains. *Vet Microbiol* 2007; 122: 258-69.

Deshpande M, Abdelmagid O, Tubbs A, Jayappa H, Wasmoen T. Experimental reproduction of canine influenza virus H3N8 infection in young puppies. *Vet Ther* 2009; 10: 29-39.

Didcock L, Young DF, Goodbourn S, Randall RE. Sendai virus and simian virus 5 block activation of interferon-responsive genes: importance for virus pathogenesis. *J Virol* 1999; 73: 3125-33.

Dingermann T. Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In: Dingermann T, editor. *Gentechnik-Biotechnik*. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges., 1999, p: 40-3.

Ditchfield J, Macpherson LW, Zbitnew A. Association of canine adenovirus (Toronto A 26/61) with an outbreak of laryngotracheitis ("Kennel Cough"): A preliminary report. *Can Vet J* 1962; 3: 238-47.

Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* 1997; 51: 151-78.

Douglas E, Coote JG, Parton R, McPheat W. Identification of *Bordetella pertussis* in nasopharyngeal swabs by PCR amplification of a region of the adenylate cyclase gene. *J Med Microbiol* 1993; 38: 140-4.

Dubovi EJ, Njaa BL. Canine influenza. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2008; 38: 827-35.

Dubovi EJ. Canine influenza. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010; 40: 1063-71.

Eccles R. Acute cooling of the body surface and the common cold. *Rhinology* 2002; 40: 109-14.

Ek-Kommonen C, Sihvonen L, Pekkanen K, Rikula U, Nuotio L. Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland. *Vet Rec* 1997; 141: 380-3.

Elia G, Decaro N, Martella V, Cirone F, Lucente MS, Lorusso E, Di Trani L, Buonavoglia C. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 2006; 136: 171-6.

Ellis J, Anseeuw E, Gow S, Bryan H, Salb A, Goji N, Rhodes C, La Coste S, Smits J, Kutz S. Seroepidemiology of respiratory (group 2) canine coronavirus, canine parainfluenza virus, and *Bordetella bronchiseptica* infections in urban dogs in a humane shelter and in rural dogs in small communities. *Can Vet J* 2011; 52: 861-8.

Ellis JA, Haines DM, West KH, Burr JH, Dayton A, Townsend HG, Kanara EW, Konoby C, Crichlow A, Martin K, Headrick G. Effect of vaccination on experimental infection with *Bordetella bronchiseptica* in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218: 367-75.

Ellis JA, Krakowka GS. A review of canine parainfluenza virus infection in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2012; 240: 273-84.

Englund L, Jacobs AA, Klingeborn B, Chriel M. Seroepidemiological survey of

*Bordetella bronchiseptica* and canine parainfluenza-2 virus in dogs in Sweden. Vet Rec 2003; 152: 251-4.

Enjuanes L, Brian D, Cavanagh D, Holmes K, Lai MMC, Laude H, Masters P, Rottier P, Siddell S, Spaan WJM, Taguchi F, Talbot P. Family Coronaviridae. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Cartens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch DJ, Pringle CR, Wickner RB, editor. Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. New York: Academic Press, 2000, p: 835-49.

Erles K, Toomey C, Brooks HW, Brownlie J. Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. Virology 2003; 310: 216-23.

Erles K, Dubovi EJ, Brooks HW, Brownlie J. Longitudinal study of viruses associated with canine infectious respiratory disease. J Clin Microbiol 2004; 42: 4524-9.

Erles K, Brownlie J. Investigation into the causes of canine infectious respiratory disease: antibody responses to canine respiratory coronavirus and canine herpesvirus in two kennelled dog populations. Arch Virol 2005; 150: 1493-504.

Erles K, Shiu KB, Brownlie J. Isolation and sequence analysis of canine respiratory coronavirus. Virus Res 2007; 124: 78-87.

Erles K, Brownlie J. Canine respiratory coronavirus: an emerging pathogen in the canine infectious respiratory disease complex. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2008; 38: 815-25.

Fairchild GA, Cohen D. Serologic study of a canine adenovirus (Toronto A26/61) infection in dogs. Am J Vet Res 1969; 30: 923-8.

Fédération Cynologique Internationale. Nomenklatur der Rassen. Thuin, Belgien, 2010, <http://www.fci.be/>.

Ferry NS. A preliminary report of the bacterial findings in canine distemper. Am Vet Rev 1910: 499-504.

Ferry NS. Bacteriology and control of acute infections in laboratory animals. J Pathol 1913: 445-55.

Ferry NS, Klix HC. Bacteriology and control of contagious nasal catarrh (snuffles) of rabbits. J Lab Clin Med 1920: 311-8.

Fisk SK, Soave OA. *Bordetella bronchiseptica* in laboratory cats from central California. Lab Anim Sci 1973; 23: 33-5.

Ford RB. Canine infectious tracheobronchitis. In: Greene CE, editor. Infectious Diseases of the dog and Cat, 3 edn: Philadelphia: WB Saunders Co, 2006, p: 54-61.

Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus AD. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. J Virol 2005; 79: 2814-22.

Friedman RL. Pertussis: the disease and new diagnostic methods. Clin Microbiol Rev 1988; 1: 365-76.

Frisk AL, Konig M, Moritz A, Baumgartner W. Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. J Clin Microbiol 1999; 37: 3634-43.

Gamiz C, Martella V, Ulloa R, Fajardo R, Quijano-Hernandez I, Martinez S. Identification of a new genotype of canine distemper virus circulating in America. Vet Res Commun 2011; 35: 381-90.

Ganaway JR, Allen AM, McPherson CW. Prevention of acute *Bordetella bronchiseptica* pneumonia in a guinea pig colony. Lab Anim Care 1965; 15: 156-62.

Garcelon DK, Wayne RK, Gonzales BJ. A serologic survey of the island fox (*Urocyon littoralis*) on the Channel Islands, California. J Wildl Dis 1992; 28: 223-9.

Garnett NL, Eydeloth RS, Swindle MM, Vonderfecht SL, Strandberg JD, Luzarraga MB. Hemorrhagic streptococcal pneumonia in newly procured research dogs. J Am Vet Med Assoc 1982; 181: 1371-4.

Geldard H, Geering WA, Bagust TJ. Isolation of herpesvirus from neonatal dogs in Australia. Aust Vet J 1971; 47: 286-7.

Gerber JD, Marron AE, Bass EP, Beckenhauer WH. Effect of age and pregnancy on the antibody and cell-mediated immune responses of horses to equine herpesvirus 1. Can J Comp Med 1977; 41: 471-8.

Glaus T, Griot C, Richard A, Althaus U, Herschkowitz N, Vandeveld M. Ultrastructural and biochemical findings in brain cell cultures infected with canine distemper virus. *Acta Neuropathol* 1990; 80: 59-67.

Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* 2000; 81: 2341-64.

Goodnow RA, Shade FJ. Control of canine bordetellosis. *Mod Vet Pract* 1980; 61: 597-8.

Gorbalenya AE, Enjuanes L, Ziebuhr J, Snijder EJ. Nidovirales: evolving the largest RNA virus genome. *Virus Res* 2006; 117: 17-37.

Graham RL, Baric RS. Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J Virol* 2010; 84: 3134-46.

Green RG, Ziegler NR, Green BB, Dewey ET. Epizootic fox encephalitis - I General description. *American Journal of Hygiene* 1930; 12: 109-29.

Greene CE, Carmichael LE. Canine herpesvirus infection. In: Greene CE, editor. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 3 edn. St. Louis: Elsevier Inc., 2006, p: 47-53.

Greene E, Appel M. Canine distemper virus. In: Greene CE, editor. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Philadelphia: WB Saunders Co, 2006, p: 25-41.

Guan Y, Zheng BJ, He YQ, Liu XL, Zhuang ZX, Cheung CL, Luo SW, Li PH, Zhang LJ, Guan YJ, Butt KM, Wong KL, Chan KW, Lim W, Shortridge KF, Yuen KY, Peiris JS, Poon LL. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science* 2003; 302: 276-8.

Gueirard P, Weber C, Le Coustumier A, Guiso N. Human *Bordetella bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: persistence of bacteria in host. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2002-6.

Gur S, Acar A. A retrospective investigation of canine adenovirus (CAV) infection in adult dogs in Turkey. *J S Afr Vet Assoc* 2009; 80: 84-6.

Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med* 2001; 344: 1917-28.

Hallander HO, Storsaeter J, Mollby R. Evaluation of serology and nasopharyngeal

cultures for diagnosis of pertussis in a vaccine efficacy trial. *J Infect Dis* 1991; 163: 1046-54.

Halperin SA. Pertussis and other *Bordetella* infections. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, editor. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. New York: McGraw-Hill, 2001, p: 949-52.

Hamelin C, Jouvenne P, Assaf R. Association of a type-2 canine adenovirus with an outbreak of diarrhoeal disease among a large dog congregation. *J Diarrhoeal Dis Res* 1985; 3: 84-7.

Harvill ET, Preston A, Cotter PA, Allen AG, Maskell DJ, Miller JF. Multiple roles for *Bordetella* lipopolysaccharide molecules during respiratory tract infection. *Infect Immun* 2000; 68: 6720-8.

Hashimoto A, Hirai K, Yamaguchi T, Fujimoto Y. Experimental transplacental infection of pregnant dogs with canine herpesvirus. *Am J Vet Res* 1982; 43: 844-50.

Hashimoto A, Hirai K, Fukushi H, Fujimoto Y. The vaginal lesions of a bitch with a history of canine herpesvirus infection. *Nihon Juigaku Zasshi* 1983a; 45: 123-6.

Hashimoto A, Hirai K, Suzuki Y, Fujimoto Y. Experimental transplacental transmission of canine herpesvirus in pregnant bitches during the second trimester of gestation. *Am J Vet Res* 1983b; 44: 610-4.

He B, Paterson RG, Stock N, Durbin JE, Durbin RK, Goodbourn S, Randall RE, Lamb RA. Recovery of paramyxovirus simian virus 5 with a V protein lacking the conserved cysteine-rich domain: the multifunctional V protein blocks both interferon-beta induction and interferon signaling. *Virology* 2002; 303: 15-32.

Higgins RJ, Krakowka SG, Metzler AE, Koestner A. Experimental canine distemper encephalomyelitis in neonatal gnotobiotic dogs. A sequential ultrastructural study. *Acta Neuropathol* 1982; 57: 287-95.

Hill H, Mare CJ. Genital disease in dogs caused by canine herpesvirus. *Am J Vet Res* 1974; 35: 669-72.

Holt DE, Mover MR, Brown DC. Serologic prevalence of antibodies against canine influenza virus (H3N8) in dogs in a metropolitan animal shelter. *J Am Vet Med Assoc* 2010; 237: 71-3.



Hong S, Kim O. Molecular identification of *Mycoplasma cynos* from laboratory beagle dogs with respiratory disease. Lab Anim Res. 2012; 28: 61-6.

Horzinek MC. Vaccine use and disease prevalence in dogs and cats. Vet Microbiol 2006; 117: 2-8.

Hozbor D, Fouque F, Guiso N. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. Res Microbiol 1999; 150: 333-41.

Hsiung GD. Parainfluenza-5 virus. Infection of man and animal. Prog Med Virol 1972; 14: 241-74.

Hu RL, Huang G, Qiu W, Zhong ZH, Xia XZ, Yin Z. Detection and differentiation of CAV-1 and CAV-2 by polymerase chain reaction. Vet Res Commun 2001; 25: 77-84.

Ibricevic A, Pekosz A, Walter MJ, Newby C, Battaile JT, Brown EG, Holtzman MJ, Brody SL. Influenza virus receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells. J Virol 2006; 80: 7469-80.

Iemura R, Tsukatani R, Micallef MJ, Taneno A. Simultaneous analysis of the nasal shedding kinetics of field and vaccine strains of *Bordetella bronchiseptica*. Vet Rec 2009; 165: 747-51.

Jacobs AA, Theelen RP, Jaspers R, Horspool LJ, Sutton D, Bergman JG, Paul G. Protection of dogs for 13 months against *Bordetella bronchiseptica* and canine parainfluenza virus with a modified live vaccine. Vet Rec 2005; 157: 19-23.

Jin L, Cebra CK, Baker RJ, Mattson DE, Cohen SA, Alvarado DE, Rohrmann GF. Analysis of the genome sequence of an alpaca coronavirus. Virology 2007; 365: 198-203.

Jirjis FF, Deshpande MS, Tubbs AL, Jayappa H, Lakshmanan N, Wasmoen TL. Transmission of canine influenza virus (H3N8) among susceptible dogs. Vet Microbiol 2010; 144: 303-9.

Kaneshima T, Hohdatsu T, Satoh K, Takano T, Motokawa K, Koyama H. The prevalence of a group 2 coronavirus in dogs in Japan. J Vet Med Sci 2006; 68: 21-5.

Kaneshima T, Hohdatsu T, Hagino R, Hosoya S, Nojiri Y, Murata M, Takano T, Tanabe M, Tsunemitsu H, Koyama H. The infectivity and pathogenicity of a

group 2 bovine coronavirus in pups. J Vet Med Sci 2007; 69: 301-3.

Kapoor A, Simmonds P, Gerold G, Qaisar N, Jain K, Henriquez JA, Firth C, Hirschberg DL, Rice CM, Shields S, Lipkin WI. Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108: 11608-13.

Karpas A, Garcia FG, Calvo F, Cross RE. Experimental production of canine tracheobronchitis (kennel cough) with canine herpesvirus isolated from naturally infected dogs. Am J Vet Res 1968; 29: 1251-7.

Karron RA, Collins PL. Parainfluenza viruses. In: Knipe DM, Howley PM, editor. Fields Virology, 5 edn. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007, p: 1497-526.

Kawakami K, Ogawa H, Maeda K, Imai A, Ohashi E, Matsunaga S, Tohya Y, Ohshima T, Mochizuki M. Nosocomial outbreak of serious canine infectious tracheobronchitis (kennel cough) caused by canine herpesvirus infection. J Clin Microbiol 2010; 48: 1176-81.

Keil DJ, Fenwick B. Role of *Bordetella bronchiseptica* in infectious tracheobronchitis in dogs. J Am Vet Med Assoc 1998; 212: 200-7.

Keil DJ, Fenwick BW. Canine Respiratory Bordetellosis: Keeping up with an evolving pathogen. In: Carmichael L, editor. Recent Advances in Canine Infectious Diseases. Ithaca: International Veterinary Information Services (www.ivis.org), 2000, Document No. A0104.0100.

Kienzle TE, Abraham S, Hogue BG, Brian DA. Structure and orientation of expressed bovine coronavirus hemagglutinin-esterase protein. J Virol 1990; 64: 1834-8.

Kim D, Jeoung SY, Ahn SJ, Lee JH, Pak SI, Kwon HM. Comparison of tissue and fluid samples for the early detection of canine distemper virus in experimentally infected dogs. J Vet Med Sci 2006; 68: 877-9.

Kim MK, Jee H, Shin SW, Lee BC, Pakhrin B, Yoo HS, Yoon JH, Kim DY. Outbreak and control of haemorrhagic pneumonia due to *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* in dogs. Vet Rec 2007; 161: 528-30.

King M. Experimental models for studying mucociliary clearance. Eur Respir J 1998; 11: 222-8.

- Kirkland PD, Finlaison DS, Crispe E, Hurt AC. Influenza virus transmission from horses to dogs, Australia. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 699-702.
- Knesl O, Allan FJ, Shields S. The seroprevalence of canine respiratory coronavirus and canine influenza virus in dogs in New Zealand. *N Z Vet J* 2009; 57: 295-8.
- König M, Neiseke J, Thiel HJ. Verbreitung des caninen Herpesvirus 1 (CHV-1) in deutschen Hundezuchten. *Tierärztl Umschau* 2004; 59: 559-65.
- Laidlaw PP, Dunkin GW. Studies in dog-distemper. III. The nature of the virus. *Jour Comp Path & Therap* 1926; 39: 222-30.
- Lamb RA, Kolakofsky D. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editor. *Fields Virology*, 4 edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p: 1305-40.
- Lamb RA, Paterson RG, Jardetzky TS. Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures. *Virology* 2006; 344: 30-7.
- Lazar EC, Swango LJ, Binn LN. Serologic and infectivity studies of canine SV-5 virus. *Proc Soc Exp Biol Med* 1970; 135: 173-6.
- Levy DE, Garcia-Sastre A. The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; 12: 143-56.
- Lincoln SD, Gorham JR, Ott RL, Hegreberg GA. Etiologic studies of old dog encephalitis. I. Demonstration of canine distemper viral antigen in the brain in two cases. *Vet Pathol* 1971; 8: 1-8.
- Lincoln SD, Gorham JR, Davis WC, Ott RL. Studies of old dog encephalitis. II. Electron microscopic and immunohistologic findings. *Vet Pathol* 1973; 10: 124-9.
- Lorusso A, Decaro N, Schellen P, Rottier PJ, Buonavoglia C, Haijema BJ, de Groot RJ. Gain, preservation, and loss of a group 1a coronavirus accessory glycoprotein. *J Virol* 2008; 82: 10312-7.
- Lorusso A, Desario C, Mari V, Campolo M, Lorusso E, Elia G, Martella V, Buonavoglia C, Decaro N. Molecular characterization of a canine respiratory coronavirus strain detected in Italy. *Virus Res* 2009; 141: 96-100.
- Lou TY, Wenner HA. Natural and experimental infection of dogs with reovirus, type 1 - pathogenicity of strain for other animals. *American Journal of Hygiene*

1963; 77: 293.

Macartney L, Cavanagh HM, Spibey N. Isolation of canine adenovirus-2 from the faeces of dogs with enteric disease and its unambiguous typing by restriction endonuclease mapping. *Res Vet Sci* 1988; 44: 9-14.

Mannering SA, McAuliffe L, Lawes JR, Erles K, Brownlie J. Strain typing of *Mycoplasma cynos* isolates from dogs with respiratory disease. *Vet Microbiol* 2009; 135: 292-6.

Markwell M. New frontiers opened by the exploration of host cell receptor. In: Kingsbury D, editor. *The Paramyxoviruses*, New York: Plenum Press, 1991, p: 407-26.

Martella V, Elia G, Buonavoglia C. Canine distemper virus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2008; 38: 787-97.

Martina BE, Harder TC, Osterhaus AD. Genetic characterization of the unique short segment of phocid herpesvirus type 1 reveals close relationships among alphaherpesviruses of hosts of the order Carnivora. *J Gen Virol* 2003; 84: 1427-30.

Marusyk RG, Yamamoto T. Characterization of a canine adenovirus hemagglutinin. *Can J Microbiol* 1971; 17: 151-5.

Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 4620-4.

Matthews REF. Classification and nomenclature of viruses. Fourth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 1982; 17: 1-199.

Mazumder SA, Cleveland KO. *Bordetella bronchiseptica* bacteremia in a patient with AIDS. *South Med J* 2010; 103: 934-5.

McCandlish IA, Thompson H, Wright NG. Kennel cough: Vaccination against *Bordetella bronchiseptica* infection. *Vet Rec* 1976; 98: 156-7.

McCandlish IA, Thompson H, Cornwell HJ, Wright NG. A study of dogs with kennel cough. *Vet Rec* 1978; 102: 293-301.

Meng Q, Qiao J, Guo X. Cloning and sequence analysis of fusion protein gene of canine parainfluenza virus wildtype strain. *Gene bank*, 2003,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Mitchell JA, Brooks H, Shiu KB, Brownlie J, Erles K. Development of a quantitative real-time PCR for the detection of canine respiratory coronavirus. *J Virol Methods* 2009; 155: 136-42.

Miyoshi M, Ishii Y, Takiguchi M, Takada A, Yasuda J, Hashimoto A, Okazaki K, Kida H. Detection of canine herpesvirus DNA in the ganglionic neurons and the lymph node lymphocytes of latently infected dogs. *J Vet Med Sci* 1999; 61: 375-9.

Mochizuki M, Yachi A, Ohshima T, Ohuchi A, Ishida T. Etiologic study of upper respiratory infections of household dogs. *J Vet Med Sci* 2008; 70: 563-9.

Modrow S, Falke D, Truyen U. *Molekulare Virologie*. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, 2003, p: 265-99.

Moritz A, Baumgärtner W, Frisk AL, König M. Sensitivität und Spezifität der CDV-RT-PCR zur Diagnose der kaninen Staupe. *Tierarztl Prax* 2003; 1: 60-6.

Morrison MD, Onions DE, Nicolson L. Complete DNA sequence of canine adenovirus type 1. *J Gen Virol* 1997; 78 ( Pt 4): 873-8.

Motohashi T, Tajima M. Isolation of a herpes virus from a diseased adult dog in Japan. *Nihon Juigaku Zasshi* 1966; 28: 307-14.

Muranaka M, Yamanaka T, Katayama Y, Hidari K, Kanazawa H, Suzuki T, Oku K, Oyamada T. Distribution of influenza virus sialoreceptors on upper and lower respiratory tract in horses and dogs. *J Vet Med Sci* 2011; 73: 125-7.

Murphy F. Coronavirus. National Institutes of Health - Office of Science Education, 1975, <http://science.education.nih.gov/>.

Neumann G, Kawaoka Y. Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 881-6.

Okuda Y, Ishida K, Hashimoto A, Yamaguchi T, Fukushi H, Hirai K, Carmichael LE. Virus reactivation in bitches with a medical history of herpesvirus infection. *Am J Vet Res* 1993a; 54: 551-4.

Okuda Y, Hashimoto A, Yamaguchi T, Fukushi H, Mori S, Tani M, Hirai K, Carmichael L. Repeated canine herpesvirus (CHV) reactivation in dogs by an immunosuppressive drug. *Cornell Vet* 1993b; 83: 291-302.

Parisien JP, Lau JF, Horvath CM. STAT2 acts as a host range determinant for species-specific paramyxovirus interferon antagonism and simian virus 5 replication. *J Virol* 2002; 76: 6435-41.

Passerini De Rossi BN, Friedman LE, Darnaud S, De Torres RA, Franco MA. Characterization of intermediate phenotypes induced by chemically undefined laboratory media in virulent *Bordetella bronchiseptica* strains. *J Gen Appl Microbiol* 2001; 47: 39-46.

Payungporn S, Crawford PC, Kouo TS, Chen LM, Pompey J, Castleman WL, Dubovi EJ, Katz JM, Donis RO. Influenza A virus (H3N8) in dogs with respiratory disease, Florida. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 902-8.

Peiris JS, de Jong MD, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 243-67.

Percy DH, Munnel JF, Olander HJ, Carmichael LE. Pathogenesis of canine herpesvirus encephalitis. *Am J Vet Res* 1970; 31: 145-56.

Perlman S, Netland J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 439-50.

Pesavento PA, Hurley KF, Bannasch MJ, Artiushin S, Timoney JF. A clonal outbreak of acute fatal hemorrhagic pneumonia in intensively housed (shelter) dogs caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Vet Pathol* 2008; 45: 51-3.

Pfefferle S, Oppong S, Drexler JF, Gloza-Rausch F, Ipsen A, Seebens A, Muller MA, Annan A, Vallo P, Adu-Sarkodie Y, Kruppa TF, Drosten C. Distant relatives of severe acute respiratory syndrome coronavirus and close relatives of human coronavirus 229E in bats, Ghana. *Emerg Infect Dis* 2009; 15: 1377-84.

Philippa JD, Leighton FA, Daoust PY, Nielsen O, Pagliarulo M, Schwantje H, Shury T, Van Herwijnen R, Martina BE, Kuiken T, Van de Bildt MW, Osterhaus AD. Antibodies to selected pathogens in free-ranging terrestrial carnivores and marine mammals in Canada. *Vet Rec* 2004; 155: 135-40.

Pittman M. Genus *Bordetella* Moreno-López. In: Buchanan RE, Gibbons NE, editor. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8 edn. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1974, p: 282-3.

Poole E, He B, Lamb RA, Randall RE, Goodbourn S. The V proteins of simian

virus 5 and other paramyxoviruses inhibit induction of interferon-beta. *Virology* 2002; 303: 33-46.

Poste G, King N. Isolation of a herpesvirus from the canine genital tract: association with infertility, abortion and stillbirths. *Vet Rec* 1971; 88: 229-33.

Pratelli A, Elia G, Martella V, Palmieri A, Cirone F, Tinelli A, Corrente M, Buonavoglia C. Prevalence of canine coronavirus antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay in dogs in the south of Italy. *J Virol Methods* 2002; 102: 67-71.

Priestnall SL, Brownlie J, Dubovi EJ, Erles K. Serological prevalence of canine respiratory coronavirus. *Vet Microbiol* 2006; 115: 43-53.

Priestnall SL, Pratelli A, Brownlie J, Erles K. Serological prevalence of canine respiratory coronavirus in southern Italy and epidemiological relationship with canine enteric coronavirus. *J Vet Diagn Invest* 2007; 19: 176-80.

Priestnall SL, Erles K, Brooks HW, Cardwell JM, Waller AS, Paillot R, Robinson C, Darby AC, Holden MT, Schoniger S. Characterization of pneumonia due to *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* in dogs. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17: 1790-6.

Prydie J, Harrison MJ, Graham J. Isolation of a canine herpes virus. *Vet Rec* 1966; 79: 660-1.

Quinn PJ, Markey BK, Carter ME. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Oxford, Blackwell Science 2002: 155-8.

Reading MJ, Field HJ. A serological study of canine herpes virus-1 infection in the English dog population. *Arch Virol* 1998; 143: 1477-88.

Redondo JJ, Suesta P, Serra I, Soler C, Soler G, Gil L, Gomez-Villamandos RJ. Retrospective study of the prevalence of postanaesthetic hypothermia in dogs. *Vet Rec* 2012; 171: 374.

Reizenstein E, Johansson B, Mardin L, Abens J, Mollby R, Hallander HO. Diagnostic evaluation of polymerase chain reaction discriminative for *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella bronchiseptica*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993; 17: 185-91.

Renshaw R, Laverack M, Zylich N, Glaser A, Dubovi E. Genomic analysis of a

pneumovirus isolated from dogs with acute respiratory disease. *Vet Microbiol* 2011; 150: 88-95.

Renshaw RW, Zyllich NC, Laverack MA, Glaser AL, Dubovi EJ. Pneumovirus in dogs with acute respiratory disease. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 993-5.

Rijsewijk FA, Luiten EJ, Daus FJ, van der Heijden RW, van Oirschot JT. Prevalence of antibodies against canine herpesvirus 1 in dogs in The Netherlands in 1997-1998. *Vet Microbiol* 1999; 65: 1-7.

Robinson AJ, Crerar SK, Waight Sharma N, Muller WJ, Bradley MP. Prevalence of serum antibodies to canine adenovirus and canine herpesvirus in the European red fox (*Vulpes vulpes*) in Australia. *Aust Vet J* 2005; 83: 356-61.

Rodriguez-Tovar LE, Ramirez-Romero R, Valdez-Nava Y, Nevarez-Garza AM, Zarate-Ramos JJ, Lopez A. Combined distemper-adenoviral pneumonia in a dog. *Can Vet J* 2007; 48: 632-4.

Roizmann B, Desrosiers RC, Fleckenstein B, Lopez C, Minson AC, Studdert MJ. The family Herpesviridae: an update. The Herpesvirus Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch Virol* 1992; 123: 425-49.

Ronsse V, Verstegen J, Onclin K, Guiot AL, Aeberle C, Nauwynck HJ, Poulet H. Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in the Belgian dog population in 2000. *Reprod Domest Anim* 2002; 37: 299-304.

Rosas C, Van de Walle GR, Metzger SM, Hoelzer K, Dubovi EJ, Kim SG, Parrish CR, Osterrieder N. Evaluation of a vectored equine herpesvirus type 1 (EHV-1) vaccine expressing H3 haemagglutinin in the protection of dogs against canine influenza. *Vaccine* 2008; 26: 2335-43.

Rosenberg FJ, Lief FS, Todd JD, Reif JS. Studies of canine respiratory viruses. I. Experimental infection of dogs with an SV5-like canine parainfluenza agent. *Am J Epidemiol* 1971; 94: 147-65.

Rosendal S. Canine mycoplasmas: pathogenicity of mycoplasmas associated with distemper pneumonia. *J Infect Dis* 1978; 138: 203-10.

Rosendal S. Canine mycoplasmas: their ecologic niche and role in disease. *J Am Vet Med Assoc* 1982; 180: 1212-4.

Rota PA, Maes RK. Homology between feline herpesvirus-1 and canine



herpesvirus. Arch Virol 1990; 115: 139-45.

Russell WC. Adenoviruses: update on structure and function. J Gen Virol 2009; 90: 1-20.

Sagazio P, Cirone F, Pratelli A, Tempesta M, Buonavoglia C, Sasanelli M, Rubino G. Infezione da herpesvirus del cane: diffusione sierologica in Puglia. Obiettivi e Documenti Veterinari 1998; 5: 63-7.

Sanderson CM, McQueen NL, Nayak DP. Sendai virus assembly: M protein binds to viral glycoproteins in transit through the secretory pathway. J Virol 1993: 651-63.

Saona-Black L. Infection of certain cell cultures and dogs and cats with a canine isolate of paramyxovirus. Cornell University, 1969, MS Thesis.

Sen GC. Viruses and interferons. Annu Rev Microbiol 2001; 55: 255-81.

Shell LG. Canine Distemper. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1990; 12: 173-9.

Shelton ME, Draper DD, Farrington DO. Control of a tracheobronchitis epizootic associated with *Bordetella bronchiseptica* in a closed dog colony. Vet Med Small Anim Clin 1977; 72: 189-93.

Siddell S, Snijder EJ. An introduction to Nidovirus. In: Perlman S, Gallagher T, Snijder EJ, editor, Nidoviruses. Washington DC: ASM Press, 2008, p: 1-13.

Sidhu MS, Husar W, Cook SD, Dowling PC, Udem SA. Canine distemper terminal and intergenic non-protein coding nucleotide sequences: completion of the entire CDV genome sequence. Virology 1993; 193: 66-72.

Song D, Kang B, Lee C, Jung K, Ha G, Kang D, Park S, Park B, Oh J. Transmission of avian influenza virus (H3N2) to dogs. Emerg Infect Dis 2008; 14: 741-6.

Song D, Lee C, Kang B, Jung K, Oh T, Kim H, Park B, Oh J. Experimental infection of dogs with avian-origin canine influenza A virus (H3N2). Emerg Infect Dis 2009; 15: 56-8.

Spertzel RO, Huxsoll DL, McConnell SJ, Binn LN, Yager RH. Recovery and characterization of a herpes-like virus from dog kidney cell cultures. Proc Soc Exp Biol Med 1965; 120: 651-5.

- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 227-64.
- Stein VM, Czub M, Schreiner N, Moore PF, Vandeveld M, Zurbriggen A, Tipold A. Microglial cell activation in demyelinating canine distemper lesions. *J Neuroimmunol* 2004; 153: 122-31.
- Steinfeld A, Prenger-Beringhoff E, Bauer N, Weiß R, Moritz A. Bakterienisolate aus dem unteren Respirationstrakt von erkrankten Hunden und deren aktuelle Resistenzsituation. *Tierarztl Prax* 2012; 5: 309-17.
- Stettler M, Beck K, Wagner A, Vandeveld M, Zurbriggen A. Determinants of persistence in canine distemper viruses. *Vet Microbiol* 1997; 57: 83-93.
- Stewart SE, David-Ferreira J, Lovelace E, Landon J, Stock N. Herpes-like virus isolated from neonatal and fetal dogs. *Science* 1965; 148: 1341-3.
- Sumner CM, Rozanski EA, Sharp CR, Shaw SP. The use of deep oral swabs as a surrogate for transoral tracheal wash to obtain bacterial cultures in dogs with pneumonia. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2011; 21: 515-20.
- Suzuki Y, Ito T, Suzuki T, Holland RE, Jr., Chambers TM, Kiso M, Ishida H, Kawaoka Y. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. *J Virol* 2000; 74: 11825-31.
- Swango LJ, Wooding WL, Jr., Binn LN. A comparison of the pathogenesis and antigenicity of infectious canine hepatitis virus and the A26-61 virus strain (Toronto). *J Am Vet Med Assoc* 1970; 156: 1687-96.
- Taguchi M, Namikawa K, Maruo T, Orito K, Lynch J, Sahara H. Antibody titers for canine parvovirus type-2, canine distemper virus, and canine adenovirus type-1 in adult household dogs. *Can Vet J* 2011; 52: 983-6.
- Takumi A, Kusanagi K, Tuchiya K, Xuan XN, Azetaka M, Takahashi E. Serodiagnosis of canine herpesvirus infection - development of an enzyme-linked immunosorbent assay and its comparison with two improved methods of serum neutralization test. *Nihon Juigaku Zasshi* 1990; 52: 241-50.
- Tang YW. Molecular diagnostics of atypical pneumonia. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24: 1308-13.
- Tham KM, Horner GW, Hunter R. Isolation and identification of canine

adenovirus type-2 from the upper respiratory tract of a dog. NZVJ 1998; 46: 102-5.

Thompson H, Wright NG, Cornwell HJ. Canine herpesvirus respiratory infection. Res Vet Sci 1972; 13: 123-6.

Thompson H, McCandlish IA, Wright NG. Experimental respiratory disease in dogs due to *Bordetella bronchiseptica*. Res Vet Sci 1976; 20: 16-23.

Thrusfield MV, Aitken CGG, Muirhead RH. A field investigation of kennel cough: incubation period and clinical signs. JSAP 1991: 215-20.

Tipold A, Jaggy A, Zurbriggen A, Vandewelde M. Neurological signs in canine distemper encephalomyelitis - a clinical study. Eur J Companion Anim Pract 1996: 33-8.

Tizard IR. Immunity at body surfaces. In: Tizard IR, editor. Veterinary Immunology: an Introduction, St. Louis: Saunders Elsevier, 2009, p: 242.

Ueland K. Serological, bacteriological and clinical observations on an outbreak of canine infectious tracheobronchitis in Norway. Vet Rec 1990; 126: 481-3.

Ulane CM, Horvath CM. Paramyxoviruses SV5 and HPIV2 assemble STAT protein ubiquitin ligase complexes from cellular components. Virology 2002; 304: 160-6.

van Regenmortel H, Fauquet C, Bishop D. Virus taxonomy. In: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. New York, 2000, p: 556-7.

Vandewelde M, Kristensen B, Braund KG, Greene CE, Swango LJ, Hoerlein BF. Chronic canine distemper virus encephalitis in mature dogs. Vet Pathol 1980; 17: 17-28.

Vandewelde M, Higgins RJ, Kristensen B, Kristensen F, Steck AJ, Kihm U. Demyelination in experimental canine distemper virus infection: immunological, pathologic, and immunohistological studies. Acta Neuropathol 1982; 56: 285-93.

Vandewelde M, Zurbriggen A. The neurobiology of canine distemper virus infection. Vet Microbiol 1995; 44: 271-80.

Vijgen L, Keyaerts E, Moes E, Thoelen I, Wollants E, Lemey P, Vandamme AM, Van Ranst M. Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus

transmission event. J Virol 2005; 79: 1595-604.

Vijgen L, Keyaerts E, Lemey P, Maes P, Van Reeth K, Nauwynck H, Pensaert M, Van Ranst M. Evolutionary history of the closely related group 2 coronaviruses: porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, bovine coronavirus, and human coronavirus OC43. J Virol 2006; 80: 7270-4.

Wang C, Miguel B, Austin FW, Keirs RW. Comparison of the immunofluorescent assay and reverse transcription-polymerase chain reaction to detect and type infectious bronchitis virus. Avian Dis 1999; 43: 590-6.

Wansley EK, Parks GD. Naturally occurring substitutions in the P/V gene convert the noncytopathic paramyxovirus simian virus 5 into a virus that induces alpha/beta interferon synthesis and cell death. J Virol 2002; 76: 10109-21.

Watt DA, Spradbrow PB, Lamberth JL. Neonatal mortality of puppies in Queensland caused by canine herpesvirus infection. Aust Vet J 1974; 50: 120-2.

Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol Rev 1992; 56: 152-79.

Weiss SR, Navas-Martin S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. Microbiol Mol Biol Rev 2005; 69: 635-64.

Willoughby K, Bennett M, McCracken CM, Gaskell RM. Molecular phylogenetic analysis of felid herpesvirus 1. Vet Microbiol 1999; 69: 93-7.

Winstanley C, Hales BA, Sibanda LM, Dawson S, Gaskell RM, Hart CA. Detection of type III secretion system genes in animal isolates of *Bordetella bronchiseptica*. Vet Microbiol 2000; 72: 329-37.

Woolfrey BF, Moody JA. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. Clin Microbiol Rev 1991; 4: 243-55.

Wright NG, Thompson H, Taylor D, Cornwell HJ. *Bordetella bronchiseptica*: a re-assessment of its role in canine respiratory disease. Vet Rec 1973; 93: 486-7.

Wright NG, Thompson H, Cornwell HJ, Taylor D. Canine respiratory virus infections. J Small Anim Pract 1974; 15: 27-35.

Wright PF, Webster RG. Orthomyxoviruses. Philadelphia: Lippincott, William & Wilkins, 2001, p: 1533-39.

Yachi A, Mochizuki M. Survey of dogs in Japan for group 2 canine coronavirus infection. J Clin Microbiol 2006; 44: 2615-8.

Yokomori K, La Monica N, Makino S, Shieh CK, Lai MM. Biosynthesis, structure, and biological activities of envelope protein gp65 of murine coronavirus. Virology 1989; 173: 683-91.

Yoon KJ, Cooper VL, Schwartz KJ, Harmon KM, Kim WI, Janke BH, Strohhahn J, Butts D, Troutman J. Influenza virus infection in racing greyhounds. Emerg Infect Dis 2005; 11: 1974-6.

Yoon S-S, Byun J-W, Park Y-I, Kim M-J, Bae Y-C, Song J-Y. Comparison of the diagnostic methods on the canine adenovirus type 2 infection. BAAP 2010; 3: 52-6.

Young DF, Didcock L, Goodbourn S, Randall RE. Paramyxoviridae use distinct virus-specific mechanisms to circumvent the interferon response. Virology 2000; 269: 383-90.

Yuk MH, Harvill ET, Cotter PA, Miller JF. Modulation of host immune responses, induction of apoptosis and inhibition of NF-kappaB activation by the Bordetella type III secretion system. Mol Microbiol 2000; 35: 991-1004.

Zeugswetter F, Weissenböck H, Shibly S, Hassan J, Spergser J. Lethal bronchopneumonia caused by *Mycoplasma cynos* in a litter of golden retriever puppies. Vet Rec 2007; 161: 626-7.

Zurbriggen A, Graber HU, Wagner A, Vandewelde M. Canine distemper virus persistence in the nervous system is associated with noncytolytic selective virus spread. J Virol 1995; 69: 1678-86.

## IX. ANHANG

### 1. Anamnesebogen für Patientenbesitzer

**Studie: Untersuchung viraler Erreger und Bordetella bronchiseptica bei kaninen Atemwegsproblemen**

**Besitzerfragebogen für akut respiratorische Hunde**

Patientennummer:

Angaben zur Person:

1. Vor- und Zuname: \_\_\_\_\_

PLZ/Ort: \_\_\_\_\_

Telefon: \_\_\_\_\_

eMail: \_\_\_\_\_

Angaben zum Hund:

2. Name: \_\_\_\_\_ Alter: \_\_\_\_\_

Rasse: \_\_\_\_\_

(Zutreffendes bitte ankreuzen)

3. Geschlecht: ☐ männlich ☐ weiblich und ☐ kastriert

4. Woher stammt Ihr Hund? (z.B. Tierheim, Tierpension, Zucht) \_\_\_\_\_

5. War Ihr Hund schon einmal im Ausland?

☐ ja, und zwar in \_\_\_\_\_ ☐ nein

6. In welchem Umfeld wird Ihr Hund hauptsächlich gehalten?

☐ Stadt ☐ Land ☐ Sonstiges: \_\_\_\_\_

7. Hat oder hatte Ihr Hund Kontakt zu Katzen, Pferden, Kühen, Schweinen, Vögeln oder Wildtieren?  
(zutreffende/s Tier/e bitte unterstreichen) ☐ ja ☐ nein

8. Hat Ihr Hund Kontakt zu anderen Hunden?

☐ ja ☐ nein

Wenn ja: Wie oft? ☐ ständig ☐ regelmäßig ☐ gelegentlich

9. War Ihr Hund in der Vergangenheit in einer/einem Hundepension, Hundeschule oder Tierheim?

☐ ja ☐ nein

Wenn ja: Wo und Wann? \_\_\_\_\_

10. Seit wann haben Sie bei Ihrem Hund die Atemwegssymptome (z.B. Husten, Niesen, Nasenausfluss) bemerkt (Angabe in Tagen)? \_\_\_\_\_

Wie veränderten sich die Symptome?

☐ besser ☐ schlechter ☐ gleichbleibend

11. Verschlechtern sich die Symptome bei Anstrengung?

☐ ja ☐ nein

12. Hatte Ihr Hund in der Vergangenheit schon einmal Atemwegssymptome?

☐ ja

☐ nein

Wenn ja: Wann? Und welche Symptome?

\_\_\_\_\_

13. Hat Ihr Hund momentan noch weitere akute Symptome, wie z.B. Durchfall, Erbrechen?

☐ ja

☐ nein

Wenn ja, welche?

\_\_\_\_\_

14. Besitzen Sie weitere Tiere? ☐ ja

☐ nein

Wenn ja: Welche?

Zeigen diese ebenfalls Atemwegssymptome?

☐ ja

☐ nein

15. Sind in Ihrem Haushalt Personen mit Atemwegssymptomen?

☐ ja

☐ nein

16. Sind Atemwegsprobleme bei anderen Hunden aus der Umgebung (z.B. Hundeschule, Freunden) bekannt?

☐ ja

☐ nein

17. Ist Ihr Hund aktuell geimpft? ☐ ja: Datum der Impfung: \_\_\_\_\_

☐ nein

Wenn ja, welche Impfung? ☐ Standardimpfung (SHP+LT)

zusätzlich gegen

☐ Bordetellen

☐ Parainfluenza

(bitte Impfpass vorzeigen)

Ich bin damit einverstanden, dass meinem Hund im Rahmen der normalen Blutuntersuchung zu wissenschaftlichen Zwecken 3 ml Blut und ein Tupfer zum Nachweis von Viren aus dem Rachen/Nasenbereich entnommen werden und die Angaben zu meinem Hund im Rahmen der Studie verwendet werden.

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

## 2. Untersuchungsbogen

### Studie: virale Erreger und Bordetella bronchiseptica bei akut respiratorischer Erkrankung beim Hund

Untersuchungsbogen (für Hunde mit akut respiratorischen Symptomen)

Patientennummer: \_\_\_\_\_

Name (Besitzer): \_\_\_\_\_

Name (Hund): \_\_\_\_\_

1. Allgemeinzustand	<input type="checkbox"/> obB <input type="checkbox"/> ggr. reduziert <input type="checkbox"/> mgr. reduziert <input type="checkbox"/> hgr. reduziert
2. Nasenausfluss	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> serös <input type="checkbox"/> seromukös <input type="checkbox"/> mukös <input type="checkbox"/> purulent <input type="checkbox"/> sonstiges _____ <input type="checkbox"/> einseits <input type="checkbox"/> beidseits
3. Husten	<input type="checkbox"/> auslösbar <input type="checkbox"/> nicht auslösbar <input type="checkbox"/> produktiv <input type="checkbox"/> unproduktiv <input type="checkbox"/> sonstiges _____
4. Niesen	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
5. Lnn. mandibularis	<input type="checkbox"/> obB <input type="checkbox"/> vergrößert
6. Temperatur (in C °)	_____ °C
7. Dyspnoe	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> ggr. <input type="checkbox"/> mgr. <input type="checkbox"/> hgr.
8. Veränderungen bei Auskultation Lunge	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> inspiratorisch <input type="checkbox"/> expiratorisch <input type="checkbox"/> in- und expiratorisch <input type="checkbox"/> Stridor <input type="checkbox"/> sonstiges _____
9. Atemfrequenz (x/min.)	_____
10. Herzfrequenz (x/min.)	_____

Zusätzliche klinische Veränderungen und Bemerkungen:



## **X. DANKSAGUNG**

Ich möchte allen danken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben:

Besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann, die mir ermöglichte während der Erstellung der Doktorarbeit in der Medizinischen Kleintierklinik als Tierärztin wichtige Erfahrungen und Eindrücke für den weiteren beruflichen Werdegang zu sammeln. Ich bedanke mich für ihre Unterstützung und Korrekturvorschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Betreuerin, Frau Dr. Bianka Schulz. Durch ihre Unterstützung und hilfreiche Anleitung, sowie die unermüdlichen Korrekturen der Arbeit konnte diese Arbeit letztendlich eingereicht werden.

Frau Dr. Karin Weber danke ich für ihre Unterstützung im Labor und bei der statistischen Auswertung.

Einen Dank möchte ich Herrn Dr. Hans-Jörg Balzer aussprechen, der mir ermöglichte bei IDEXX, Vet Med Labor GmbH in Ludwigsburg, Deutschland Einblicke in die Analyse der Tupferproben zu bekommen.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Glöckner, dem Tierheim Beckstetten/Jengen, sowie dem Veterinärwissenschaftlichen Department, Lehrstuhl für Tierernährung und Diätetik der Ludwig-Maximilians-Universität München für das Sammeln von Proben und Bereitstellen von Studienteilnehmern.

Allen Mitarbeitern der Medizinischen Kleintierklinik danke ich für eine unvergessliche Zeit, in der ich sehr viel gelernt und viele nette Leute kennengelernt habe.

Bedanken möchte ich mich bei meinen Freunden, die mir immer zur Seite standen, mich aufgemuntert, motiviert und abgelenkt haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner ganzen Familie und meinem Freund bedanken, die mir immer zur Seite standen und mir hilfreiche Tipps gaben, die zum Gelingen der Arbeit beitrugen. Ohne die finanzielle Unterstützung meiner Eltern und ihren Rückhalt wären das Tiermedizinstudium und die Doktorarbeit nicht umsetzbar gewesen.